

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA MARIA RAYMUNDI

O PREJUÍZO DA CONSOLIDAÇÃO E GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE  
MEDO INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE CANABIDIOL DEPENDE DE  
MÚLTIPLOS MECANISMOS NO HIPOCAMPO DORSAL

CURITIBA

2018

ANA MARIA RAYMUNDI

O PREJUÍZO DA CONSOLIDAÇÃO E GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE  
MEDO INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE CANABIDIOL DEPENDE DE  
MÚLTIPLOS MECANISMOS NO HIPOCAMPO DORSAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Dra. Cristina Aparecida Jark Stern

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Raymundi, Ana Maria.

O prejuízo da consolidação e generalização da memória de medo induzidos pela administração de canabidiol depende de múltiplos mecanismos no hipocampo dorsal. / Ana Maria Raymundi. – Curitiba, 2018. 89 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Cristina Aparecida Jark Stern.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Canabidiol. 2. Memória. 3. Medo. 4. Hipocampo (Cérebro). 5. Citoesqueleto. 6. Proteínas. I. Título. II. Stern, Cristina Aparecida Jark. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.7827

CURITIBA, 30 DE MAIO DE 2018



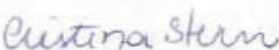
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA

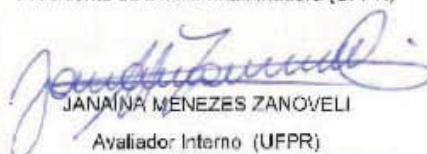
### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANA MARIA RAYMUNDI** intitulada: **O prejuízo da consolidação e generalização da memória de medo induzidos pela administração de canabidiol depende de múltiplos mecanismos no hipocampo dorsal**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Maio de 2018.

  
CRISTINA APARECIDA JARK STERN  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
JANAÍNA MENEZES ZANOLLI  
Avaliador Interno (UFPR)

  
BRUNO JACSON MARTYNHAK  
Avaliador Externo (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a minha orientadora, prof. Dra. Cristina A. J. Stern por ter confiado em mim e me dado a oportunidade de realizar esse trabalho sem ao menos ter ideia de quem eu era. Foram dois anos desafiadores, mas de muito aprendizado. Obrigada por toda a sua dedicação e por ser uma inspiração como pesquisadora pra mim.

A prof. Dra. Janaína M. Zanoveli que me aceitou primeiramente como aluna e possibilitou que eu ingressasse o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR.

Ao prof. Dr. Aleksander R. Zampronio por possibilitar a realização dos experimentos de *Western Blotting* em seu laboratório.

A prof. Dra. Joice M. da Cunha por gentilmente doar uma alíquota do WAY100635 e possibilitar a realização dos experimentos de mecanismo de ação.

Ao prof. Dr. Leandro J. Bertoglio por sempre colaborar com os nossos projetos e também com a continuidade desse trabalho. Da mesma forma ao prof. Dr. Francisco S. Guimarães, que apesar do pouco contado contribuiu com ideias valiosas para o desenvolvimento do mesmo.

Ao Dr. Vinícius A. Hiroaki-Sato e a Dra. Ana Paula Segantine, muito obrigada por todo o ensinamento, toda ajuda com as cirurgias, infusão de drogas e a Ana também por ensinar a técnica do *Western Blotting*, jamais vou esquecer o quanto vocês me ajudaram no decorrer do meu projeto.

Ao prof. Dr. Roberto Andreatini e a prof. Dra. Alexandra Acco por avaliarem minha qualificação de mestrado e contribuírem com sugestões que ajudaram a desenvolver essa dissertação e o futuro artigo a ser publicado.

Ao prof. Dr. Bruno J. Martynhak e as profs. Dra. Janaína M. Zanoveli e Dra. Joice M. da Cunha por aceitarem serem membros da minha banca de defesa. Obrigada profs. Bruno e Janaína por terem avaliado e colaborado com valiosas sugestões para a versão final desse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, em especial Thiago e Jeferson pelo convívio diário e por toda a ajuda, maior ou menor, que me deram durante o meu mestrado. A Heloísa que está chegando agora, mas já me ajudou de diversas formas. Além disso, sem o Jeferson e a Heloísa a vivência diária no laboratório não seria a mesma. A Bruna que me ajudou quando pode e por confiar em mim para auxiliar em seu projeto. A Beatriz e Suzen que não são tão presentes, mas que no geral, todos fazem eu me sentir parte de um ótimo grupo.

Aos outros colegas da Pós-Graduação pelo convívio, em especial a Camila e a Débora pelo apoio nos experimentos do *Western Blotting*. Também a Letícia Pereira por ensinar e possibilitar que as extrações das amostras teciduais fossem feitas no Laboratório de Toxicologia Ambiental.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR que contribuíram com a minha formação como pesquisadora e Mestre.

A minha família: Meus pais, Ana Cláudia e Braz, obrigada por sempre acreditarem e confiarem em mim, por deixar com que eu siga meus passos mesmo tão distante e terem que conviver cada vez mais com a minha ausência. A Marina por todo o apoio, por todas as vezes que, quando tudo parecia dizer o contrário, me fez levantar e ver que eu era capaz. Faltam-me palavras para agradecer a vocês. Também a minha irmã, Ana Julia, que mesmo com pouco contato é muito querida.

Por fim, às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESP e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

*"Fight back your demons, don't let them take you down".*

Icon for Hire - Demons



## RESUMO

Entender os mecanismos que sustentam a consolidação das memórias de medo é importante porque esses estão envolvidos na generalização, uma característica proeminente de transtornos psiquiátricos como o Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT). Classicamente, é descrito que a janela temporal da consolidação da memória dura 6 horas. No entanto, não se sabe como, tanto no hipocampo dorsal (HD) – região importante para a consolidação das memórias de medo contextuais – como dentro da janela de consolidação, o canabidiol (CBD) prejudica a consolidação e generalização da memória do medo. Nesse contexto, o CBD teria o potencial de ser uma droga preventiva para o desenvolvimento do TEPT. Assim, o primeiro objetivo foi investigar o efeito do CBD, injetado no HD, durante a janela de consolidação da memória. Para isso, ratos *Wistar* machos, com cânulas-guia implantadas bilateralmente no HD, receberam CBD (10-30 pmol) imediatamente, 30 min, 1 hora e 3 horas após a aquisição de um condicionamento de medo forte ao contexto. Foi observado que apenas imediatamente e 1 hora depois o CBD foi capaz de interferir na consolidação e generalização da memória. Além disso, imediatamente após o condicionamento, o pré-tratamento com AM251 (antagonista CB1) e AM630 (antagonista CB2), mas não com WAY100635 (antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>) foi capaz de prevenir os efeitos do CBD. A inibição seletiva da FAAH pelo URB597 (10 pmol) no HD imediatamente após o condicionamento também foi capaz de prejudicar a generalização da memória. Entretanto, 1 hora após o condicionamento, nem o AM251 e o AM630 nem o WAY100635 preveniram os efeitos do CBD, sugerindo que um mecanismo diferente esteja envolvido nesse estágio da consolidação da memória. Por fim, foi investigado se o CBD alteraria a expressão de Arc (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*), uma proteína necessária para a consolidação da memória. Foi observado que em ambos, imediatamente e 1 hora após o condicionamento de medo, o CBD reduziu a expressão da proteína Arc no HD. Juntos, esses resultados fornecem mais evidências de que o CBD prejudica a consolidação e a generalização da memória, sugerindo que no HD os mecanismos que medeiam os efeitos, imediatamente e 1 hora após a aquisição, são distintos. No entanto, em ambos os momentos, o CBD leva a diminuição da expressão de Arc.

**Palavras-chave:** Canabidiol, memória de medo, consolidação, generalização, hipocampo dorsal, proteína Arc



## ABSTRACT

To understand the mechanisms underpinning fear memories consolidation is important because it is involved in generalization, a prominent feature of psychiatric disorders like Post-traumatic Stress Disorder (PTSD). Classically, it is described that memory consolidation time-window lasts 6 hours. However, it is not known how, in the dorsal hippocampus (DH) - a region important for the consolidation of contextual fear memories - and when during the consolidation time-window, cannabidiol (CBD) impairs the fear memory consolidation and generalization. In this context, CBD would have the potential to be a preventive drug for the development of PTSD. Thus, the first objective was to investigate the CBD effect, injected into the DH, during the consolidation time-window. Therefore, male Wistar rats, with guide cannulas bilaterally implanted in the DH, received CBD (10-30 pmol) immediately, 30 min, 1 h and 3 h after acquisition of a strong training. We observed that only immediately and 1 h later, CBD was able to interfere in memory consolidation and generalization. Moreover, immediately after fear conditioning, the pre-treatment with AM251 (CB1 receptor antagonist) and AM630 (CB2 receptor antagonist), but not WAY100635 (5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist) was able to prevent the CBD effects. Together, the FAAH selective inhibition by URB597 (10 pmol) in DH immediately after fear conditioning was also able to impair the generalization of memory. However, 1 hour after fear conditioning, neither the AM251 and AM630, nor the WAY100635 prevent the CBD effects, suggesting a further mechanism involved in this stage of memory consolidation. Lastly, we investigated whether CBD would change the expression of Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein), a necessary protein for memory consolidation. We observed that both, immediately and 1 hour after fear conditioning, CBD reduced the expression of Arc protein in the DH. Together, these results provide further evidence that CBD disrupts fear memory consolidation and generalization, suggesting that in the DH the mechanisms underlying these effects, immediately and 1h after acquisition, are distinct. However, at both moments, the CBD effects depend on the Arc expression.

**Key-words:** Cannabidiol, Fear memory, Consolidation, Generalization, Dorsal Hippocampus, Arc protein

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	- Indução da LTP e remodelamento sináptico .....	16
<b>Figura 2</b>	- Etapas da formação da memória de longa duração .....	17
<b>Figura 3</b>	- A generalização da memória no modelo de condicionamento de medo ao contexto .....	23
<b>Figura 4</b>	- Os principais alvos e potenciais mecanismos de ação do CBD .	25
<b>Figura 5</b>	- O sistema endocanabinoide .....	27
<b>Figura 6</b>	- O Hipocampo Dorsal .....	29
<b>Figura 7</b>	- Representação do sítio de infusão das drogas .....	35
<b>Figura 8</b>	- O modelo de condicionamento de medo ao contexto.....	37
<b>Figura 9</b>	- O efeito do CBD imediatamente após a aquisição.....	41
<b>Figura 10</b>	- O efeito do CBD 30 minutos após a aquisição.....	42
<b>Figura 11</b>	- O efeito do CBD 1 hora após a aquisição.....	43
<b>Figura 12</b>	- O efeito do CBD 3 horas após a aquisição.....	44
<b>Figura 13</b>	- O mecanismo de ação do CBD imediatamente após a aquisição .....	45
<b>Figura 14</b>	- O efeito do URB597 imediatamente após a aquisição.....	46
<b>Figura 15</b>	- O mecanismo de ação do CBD 1 hora após a aquisição.....	48
<b>Figura 16</b>	- A expressão da Arc 90 minutos após o condicionamento.....	49
<b>Figura 17</b>	- A expressão de Arc 150 minutos após o condicionamento.....	50
<b>Figura 18</b>	- Esquema representativo do efeito e mecanismo de ação do CBD imediatamente após o condicionamento.....	66
<b>Figura 19</b>	- Esquema representativo do efeito e mecanismo de ação do CBD 1 hora após o condicionamento.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	- Graus célcus
2-AG	- 2-Aracdonoil-glicerol
5-HT	- Serotonina
AM251	- <i>N</i> -(Piperidina-1-il)-5-(4-iodofenila)-1-(2,4-diclorofenila)-4- metil-1- <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida
AM630	- (6-iodo-2-methyl-1-(2-morpholinoethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-yl) (4-methoxyphenyl) methanone; 6-iodopravadoline
AMPA	- Ácido aminometilfosfônico
AMPc	- Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	- Análise de variância
Arc	- Do inglês " <i>activity-regulated cytoskeletal protein</i> ".
BDNF	- Do inglês " <i>brain-derived neurotrophic factor</i> "
BSA:	- Albumina sérica bovina, do inglês " <i>bovine serum protein</i> "
Ca <sup>2+</sup>	- Cálcio
CB1	- Receptor canabinoide do tipo 1
CB2	- Receptor canabinoide do tipo 2
CBD	- Canabidiol
cm	- Centímetro
CPFm	- Córtex pré-frontal medial
DTT	- Dithiothreitol
EC	- Estímulo condicionado
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EI	- Estímulo incondicionado
EPM	- Erro padrão da média
FAAH	- Do inglês " <i>fatty acid amide hydrolase</i> "
GABA	- Ácido gama-aminobutírico
Gi/o	- Proteína G inibitória
h	- Horas
HD	- Hipocampo dorsal
Hz	- Hertz
i.p.	- Intraperitoneal
Kg	- Kilograma

<b>LTD</b>	- Do inglês <i>“long term depression”</i>
<b>LTP</b>	- Do inglês <i>“long term potentiation”</i>
<b>mA</b>	- Miliamper
<b>mg</b>	- Miligrama
<b>min</b>	- Minuto
<b>ml</b>	- Mililitro
<b>mm</b>	- Milímetro
<b>mM</b>	- Milimolar
<b>NaCl</b>	- Cloreto de sódio
<b>NMDA</b>	- N-metil-D-aspartato
<b>nmol</b>	- Nanomol
<b>PAG</b>	- Substância cinzenta periaquedutal
<b>pmol</b>	- Picomol
<b>PPAR</b>	- Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
<b>r.p.m.</b>	- Rotações por minuto
<b>s</b>	- Segundos
<b>SDS</b>	- Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	- Gel de poliacrilamida para eletroforese, do inglês <i>“Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”</i>
<b>TEPT</b>	- Transtorno de estresse pós-traumático
<b>TkrB</b>	- <i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
<b>TRPV1</b>	- Receptores de potencial transitório do tipo 1
<b>URB597</b>	- Ácido Ciclohexilcarbâmico 3'-(Aminocarbonila)-[1,1'-bifenila]-3-il ester
<b>V</b>	- Voltz
<b>VEI</b>	- Veículo
<b>WAY100635</b>	- Maleato de N-[2-[4-(2-Metoxifenila)-1-piperazinil]etil]-N-2-piridinil ciclohexano carboxamida
<b>Δ9-THC</b>	- Delta-9 tetrahidrocanabinol
<b>μL</b>	- Microlitro
<b>μm</b>	- Micrometro

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>15</b>
1.1. A formação das memórias.....	15
1.2. O transtorno do estresse pós-traumático.....	18
1.3. O modelo de condicionamento de medo ao contexto.....	20
1.4. O canabidiol.....	24
1.5. O hipocampo dorsal .....	28
<b>2. Hipótese.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Objetivo geral.....</b>	<b>31</b>
3.1. Objetivos específicos.....	31
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>33</b>
4.1. Animais.....	33
4.2. Drogas.....	33
4.3. Cirurgia estereotáxica.....	34
4.4. Microinfusão de drogas .....	34
4.5. Condicionamento de medo ao contexto .....	35
4.6. <i>Western Blotting</i> para expressão de Arc.....	37
4.7. Análise estatística.....	39
<b>5. Resultados.....</b>	<b>40</b>
5.1. Experimento 1: Efeito da micro-infusão do CBD no HD.....	40
5.2. Experimento 2: Mecanismo de ação do CBD imediatamente após a aquisição.....	44
5.3. Experimento 3: Efeito da micro-infusão de URB597 no HD.....	46
5.4. Experimento 4: Mecanismo de ação do CBD 1 hora após a aquisição .....	47
5.5. Experimento 5: Expressão da proteína Arc 90 e 150 minutos após o condicionamento.....	48
<b>6. Discussão.....</b>	<b>51</b>

6.1. Efeito do CBD no HD durante a janela temporal de consolidação da memória de medo.....	51
6.2. O mecanismo de ação do CBD na janela de consolidação da memória de medo.....	56
6.3. O efeito do CBD sobre a expressão da proteína Arc no HD.....	63
<b>7. Considerações Finais.....</b>	<b>68</b>
<b>8. Conclusões.....</b>	<b>70</b>
<b>9. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>71</b>

## **1. Introdução**

### **1.1. Formação das memórias**

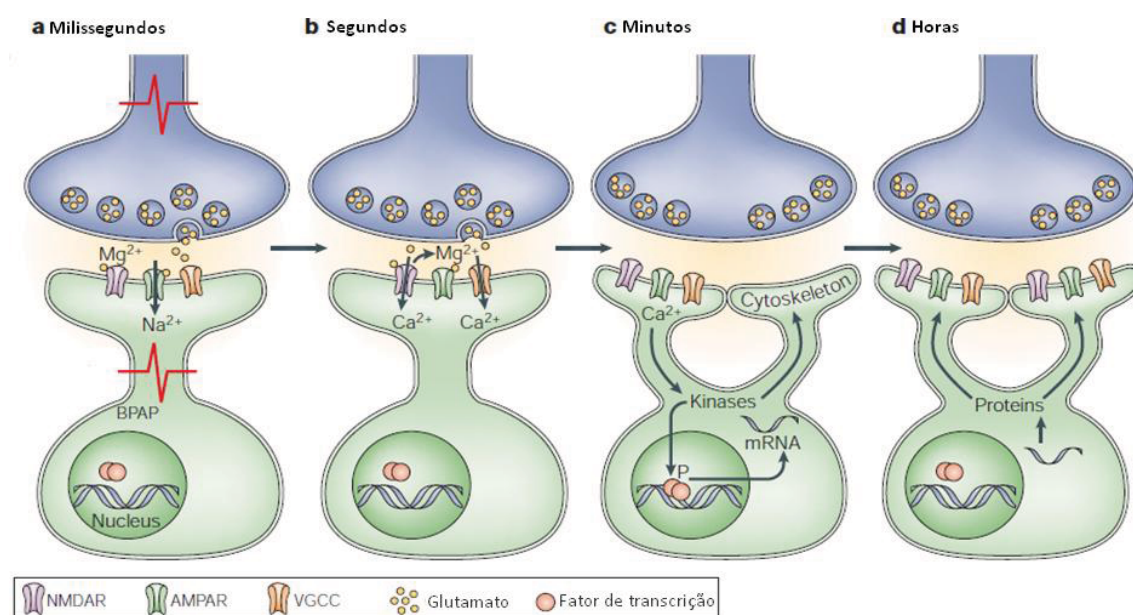
As memórias podem ser definidas como mudanças duradouras no comportamento de um indivíduo como consequência de suas experiências prévias (CHARNIAK & MCDERMOTT, 1985). Assim, os processos de formação, armazenamento e uso das memórias são críticos para as funções normais dos indivíduos, contribuindo na modulação de suas personalidades e interações sociais. No entanto, esses processos também estão no centro de diversos transtornos cognitivos e emocionais, fazendo com que o entendimento de como as memórias são formadas, evocadas e atualizadas seja de grande importância devido ao impacto que produzem em diversas áreas da vida humana, no bem-estar e na saúde mental (ALBERINI & LEDOUX, 2013).

Quando uma experiência é vivenciada pela primeira vez, essa informação é adquirida e gera o aprendizado, sendo essa etapa denominada aquisição da memória (DUDAI, 2002). Uma versão temporária dessa informação, a memória de curta duração, fica disponível para uso (IZQUIERDO et al., 1999), no entanto, para que se tenha uma versão duradoura, a memória de longa duração, é necessário que esse traço de memória adquirido seja estabilizado (DUDAI, 2004).

Assim, ao se tratar de um estímulo relevante, circuitos específicos de neurônios ativados durante a aquisição da memória sofrem alterações plásticas que sustentam o armazenamento de informações relacionadas ao evento original a longo prazo (MCGAUGH, 2000). Hebb (1949) propunha que poderiam existir mecanismos de modificações sinápticas que sustentariam a formação das memórias. Sabe-se hoje que a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long term potentiation*) é um dos mecanismos celulares e moleculares que as sustenta. Esse processo leva à modificação persistente, aumentando a resposta sináptica frente a um estímulo, sendo induzido principalmente pela ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA após uma estimulação de alta frequência (BLISS & LØMO, 1973; BLISS & COLLINGRIDGE, 1993).



Assim, este remodelamento sináptico requer o envolvimento complexo e temporalmente orquestrado de cascatas de sinalização intracelulares específicas, sistemas neurotransmissores, e síntese de proteínas (MCGAUGH, 2000), como BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) e Arc (do inglês *activity-regulated cytoskeletal protein*). A Arc, produto de um gene de expressão imediata (*immediate early gene* em inglês), é responsável pela modulação dos filamentos de actina e, conseqüentemente, modula a citoarquitetura das espinhas dendríticas, aumentando a superfície sináptica (MATUS, 2000), assim como o trânsito de receptores como os glutamatérgicos do tipo AMPA, aumentando sua densidade, e no geral a eficiência sináptica (SHEPHERD & BEAR, 2011), como exemplificado na figura 1.



**Figura 1.** Indução da LTP e remodelamento sináptico após um estímulo relevante. Entre minutos e horas após o início de sua indução, a expressão de proteínas que modulam o citoesqueleto é aumentada, aumentando a superfície sináptica. (Adaptado de LAMPRECHT & LEDOUX, 2004).

Portanto, as memórias não são codificadas instantaneamente, mas estabilizadas gradualmente ao longo do tempo, durante a etapa de consolidação. Embora os mecanismos moleculares citados só tenham sido elucidados posteriormente, essa etapa foi demonstrada por Müller & Pilzecker (1900) por observação, em humanos, de que as memórias eram passíveis de

sofrer intervenções em uma janela temporal após a aquisição. Posteriormente, em roedores, foi descrito que essa etapa ocorre dentro de um período de 6 horas (FLEXNER et al., 1967). Assim, a memória passa de um estado lábil e instável para um estado estável (Figura 2) e sabe-se que tanto agentes endógenos como hormônios do estresse, ou exógenos como inibidores de síntese proteica e de diversos sistemas de neurotransmissão são capazes de modular a consolidação de uma memória (MCGAUGH, 1983; 2000).

Uma vez a memória consolidada, a mesma pode ser evocada. A evocação é um processo que permite que a informação previamente adquirida possa ser utilizada (GIACHERO et al., 2013). Essa etapa abrange os processos de reativação ou labilização dos circuitos sinápticos formados na consolidação, que por consequência pode permitir a atualização dessa memória (ALBERINI, 2011); e de expressão, que é possível observar nos roedores através do comportamento (TULVING, 1983).



**Figura 2.** Etapas da formação de uma memória de longa duração. Após a aquisição é gerado um traço de memória instável e passível de sofrer interferências. A consolidação, em sua janela temporal, estabiliza o traço de memória e assim, se torna possível a evocação.

Sabe-se ainda que estruturas cerebrais específicas são recrutadas durante a consolidação. A importância do hipocampo é classicamente descrita desde os relatos de Scoville & Milner (1957) sobre o paciente H.M., que após ter partes do hipocampo e regiões parahipocámpais lesionadas apresentou prejuízos em consolidar novas memórias e amnésia específica de memórias recentes, mas não das remotas. Assim, a participação do hipocampo na

consolidação das memórias tem sido amplamente descrita (FANSELOW, 2000; EICHENBAUM, 2004; FANSELOW & DONG, 2010), mas sabe-se ainda que memórias de conteúdo emocional, como as memórias de medo, possuem mecanismos que determinam sua relevância a serem armazenadas em relação às demais, devido a influência de outras regiões como o córtex pré-frontal medial (CPFm) e núcleos da amígdala (TAN et al., 2011; CHOI et al., 2012; EINARSSON & NADER, 2012).

Embora outros mecanismos como os de reconsolidação (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; NADER, 2003) e persistência (DA SILVA et al., 2016) permitam que as memórias sejam mantidas ao longo do tempo, a consolidação é o primeiro mecanismo após a aquisição que irá estabilizar e armazenar uma memória de longa duração, assim também o primeiro possível de sofrer interferências farmacológicas dentro da sua janela temporal. A maioria dos estudos mostram que interferências nos primeiros minutos após a aquisição são mais efetivas (SCHMIDT et al., 2016; LUNARDI et al., 2017; ZHU et al., 2018) do que as interferências realizadas posteriormente, como por exemplo, três horas após a aquisição (GAFFORD et al., 2005), embora isso dependa do sistema de neurotransmissão, cascata intracelular e/ou da intensidade do estímulo.

Entender os mecanismos que medeiam a consolidação das memórias, em especial as memórias de medo, torna-se importante para entender também a neurobiologia de transtornos associados a essas memórias como o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) e auxiliar a busca de agentes farmacológicos que possam prejudicar a consolidação dessas memórias, uma vez que a terapia farmacológica para o TEPT ainda é bastante limitada (STEIN et al., 2006).

## **1.2. O transtorno do estresse pós-traumático**

O TEPT, segundo a última edição do manual diagnóstico e estatístico de doenças mentais (DSM-5; Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 2013), é uma doença relacionada a um trauma e estresse. Esse

transtorno acomete uma porcentagem de indivíduos que passaram por situações que causam sérios danos à saúde ou que ameaçam a continuidade de vida, gerando uma resposta intensa de medo. Essa porcentagem pode variar bastante de acordo com o tipo de evento traumático, por exemplo, em caso de mulheres que sofreram abuso sexual, cerca de 50% desenvolve o transtorno (CREAMER et al., 2001), já dentre os veteranos de guerra, a porcentagem fica em torno de 13 à 15% (TANIELIAN & JAYCOX, 2005).

Assim, o enfrentamento de uma experiência traumática e a consequente formação de uma memória associativa frente a esse evento é um consenso para o seu desenvolvimento. Sendo que um desequilíbrio no processamento dessa memória seria um dos fatores para o início da doença (MICHPOULOS et al., 2015), o que torna um dos principais critérios diagnósticos as lembranças angustiantes, recorrentes e involuntárias do evento traumático (DSM-5).

Dessa forma, os pacientes com TEPT re-experienciam a situação traumática por meio de pesadelos, *flashbacks* e reações fisiológicas em situações que relembram o trauma (HUGHES & SHIN, 2011). Esses sintomas estão relacionados a um neurocircuito que envolve o hipocampo, CPFm e amígdala na formação da memória aversiva. No TEPT, a amígdala se encontra hiper-responsiva em relação ao hipocampo e ao CPFm (HUGHES & SHIN, 2011). Além disso, alguns sistemas neurotransmissores também se mostram alterados, ocorrendo uma hiperativação noradrenérgica em relação ao sistema endocanabinoide e ao glicocorticoide (BAILEY et al., 2013).

Adicionalmente, os indivíduos expressam respostas exacerbadas de ansiedade e medo não somente frente a pistas associadas ao evento traumático, mas também em situações não relacionadas ou que não oferecem risco, caracterizando a generalização da memória de medo (JOVANOVIĆ et al., 2012; NORRHOLM et al., 2014). A generalização é uma perda de especificidade da memória e está relacionada com a intensidade com que a memória do evento traumático é consolidada, ou seja, há uma “superconsolidação” da memória de medo (EHLERS et al., 2004).

É natural que, com o passar do tempo, memórias de medo contextuais se tornem mais generalizadas, sendo esse fenômeno relacionado com os próprios

mecanismos associados às memórias remotas e sua dependência mais de áreas corticais do que do hipocampo (WILTGEN & SILVA, 2007). No entanto, quando se trata do TEPT, essa perda de especificidade é ainda mais exacerbada estando relacionada às alterações patológicas no neurocircuito citado anteriormente (JOVANOVIĆ et al., 2009; 2012; LEVY-GIGI et al., 2015). Assim, essa característica é amplamente relatada pelos pacientes que passam a evitar situações, pessoas e/ou locais, impactando grandemente seus aspectos sociais (FLEURKENS et al., 2011; KOSTEK et al., 2014).

A farmacoterapia utilizada para essa doença atualmente se resume em inibidores seletivos da recaptação de serotonina, que pode melhorar os sintomas de ansiedade dos pacientes, mas não tem efeito sobre a memória traumática, além dos casos em que o paciente não é responsivo ao tratamento (STEIN et al., 2006). Ainda, a psicoterapia de exposição prolongada, que é baseada na exposição às pistas associadas ao trauma com a finalidade de que uma memória de extinção, ou seja, uma nova memória não aversiva seja formada também tem suas limitações, já que o componente emocional da memória aversiva faz com que ela sofra o fenômeno de recuperação espontânea (LATTAL & ABEL, 2004), e assim, o indivíduo apresenta novamente as reações exacerbadas de medo. Adicionalmente, devido a idade da memória ao se buscar o tratamento e também a sua intensidade, as memórias relacionadas ao TEPT tendem a ser resistentes a labilização. Essa característica faz com que fármacos capazes de prejudicar a reconsolidação em modelos animais, tenham baixa eficácia quando testados em pacientes (WOOD et al., 2015). Dessa forma, seria interessante se os indivíduos que passassem por situações extremamente traumáticas pudessem ser prevenidos quanto ao desenvolvimento da doença.

### **1.3. O modelo de condicionamento de medo ao contexto**

Da perspectiva etológica, o medo e ansiedade são respostas adaptativas. No entanto, enquanto a ansiedade é associada a comportamentos que ocorrem devido a ameaças potenciais, sinalizadas ou ambíguas, o medo é associado a comportamentos que ocorrem devido a exposição a estímulos

claramente ameaçadores. Dessa maneira, as respostas de medo podem ser avaliadas pela sua capacidade de serem condicionadas a estímulos associados a essas ameaças (BLANCHARD et al., 2008). Da mesma forma, sabe-se que o aprendizado associativo, em especial o aversivo, é um mecanismo existente em diversas espécies animais, e está bastante relacionado aos mecanismos adaptativos de sobrevivência (FANSELOW, 1994).

Desde o estudo de Pavlov abrangendo as memórias associativas (PAVLOV, 1927) – embora seu trabalho se tratasse de memórias apetitivas – modelos de condicionamento clássico têm sido amplamente utilizados para o estudo de memórias aversivas e têm contribuído para o entendimento das etapas de formação das mesmas. O condicionamento Pavloviano encontra-se em grande destaque devido sua facilidade em relacionar as etapas de formação das memórias às etapas utilizadas nos protocolos de condicionamento (BOUTON & MOODY, 2004).

Quando esse modelo é utilizado, os animais são apresentados a um estímulo sensorial prévio, até então neutro, como um som, odor, luz ou contexto – sendo esse o estímulo condicionado (EC). No caso do medo contextual, os animais formam uma representação espacial relacionada ao contexto previamente exposto, sendo esse processo importante para o estabelecimento de uma memória contextual de longa duração (FANSELOW, 2010). Assim, posteriormente é feito o pareamento desse EC a um estímulo aversivo, usualmente choques nas patas – sendo esse o estímulo incondicionado (EI). O EI aversivo naturalmente induz uma resposta comportamental de medo, assim esse pareamento leva a formação de uma memória de medo associativa.

Esse momento é denominado sessão treino ou sessão de condicionamento, em que há a aquisição da memória aversiva, e nas horas seguintes se dá a sua consolidação. A posterior re-exposição ao EC na ausência do EI é capaz de induzir respostas comportamentais, sendo essa a sessão de evocação da memória. Assim, os animais demonstram comportamentos de defesa frente ao EC, como fuga, esquiva ou congelamento



(LEDOUX, 2000). No caso do condicionamento de medo ao contexto é comum se avaliar o comportamento de congelamento, definido como a total ausência de movimentos do corpo e da cabeça exceto aqueles associados à respiração (BLANCHARD & BLANCHARD, 1969), como parâmetro de retenção da memória.

Ainda, é possível testar a especificidade da memória expondo os animais a um contexto diferente daquele em que foram condicionados. Sendo esse um contexto novo e neutro, quando se tratar de uma memória específica o animal não evocará a memória aversiva. No entanto se o animal apresentar elevadas expressões de medo, isso caracterizará a generalização da memória, ou seja, sua perda de especificidade (GAZARINI et al., 2014; STERN et al., 2017).

De maneira geral, os modelos clássicos que abrangem memórias aversivas não mimetizam aspectos patológicos e características do TEPT como a generalização e a resistência tanto à labilidade quanto à extinção das memórias. Essas características estão associadas com o processo denominado superconsolidação da memória, onde a memória frente à situação ameaçadora é consolidada intensamente devido a grandeza desse estímulo (FANSELOW & PONNUSAMY, 2008; NESTLER & HYMAN, 2010).

Dessa forma, uma alternativa para modelar memórias traumáticas seria a simulação de características fisiológicas do TEPT, como alterações neuroendócrinas (FANSELOW & PONNUSAMY, 2008). Resultados prévios do nosso grupo mostram que a potencialização da transmissão noradrenérgica promovida pela administração sistêmica da ioimbina (antagonista dos receptores  $\alpha 2$ -adrenérgicos) leva a uma superconsolidação da memória (GAZARINI et al., 2013). No entanto, diversos trabalhos tanto do nosso (GAZARINI et al., 2014; STERN et al., 2017) como de outros grupos (BALDI et al., 2004; KROON & CAROBREZ, 2009; FINSTERWALD et al., 2015) mostram que dependendo da intensidade do condicionamento, os animais perdem a capacidade de restringir a expressão do medo apenas no contexto condicionado. Assim, o aumento da intensidade do treino mimetiza a generalização da memória quando o animal é exposto a um contexto neutro (Figura 3).





**Figura 3.** A generalização é representada pela expressão de medo em ambientes não relacionados à situação traumática, mimetizando um dos sintomas do TEPT (GAZARINI, 2015)

O condicionamento de medo ao contexto recruta regiões encefálicas na formação da memória como o hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala (PARÉ, 2002; KIM & JUNG, 2006), sendo o hipocampo de grande importância já que sua integridade se mostra essencial para que as memórias contextuais sejam adquiridas e consolidadas (FANSELOW, 2000). Sabe-se ainda que dentre os sistemas neurotransmissores que podem participar do processamento dessas memórias, o sistema endocanabinoide tem uma grande influência (NEUMEISTER et al., 2015).

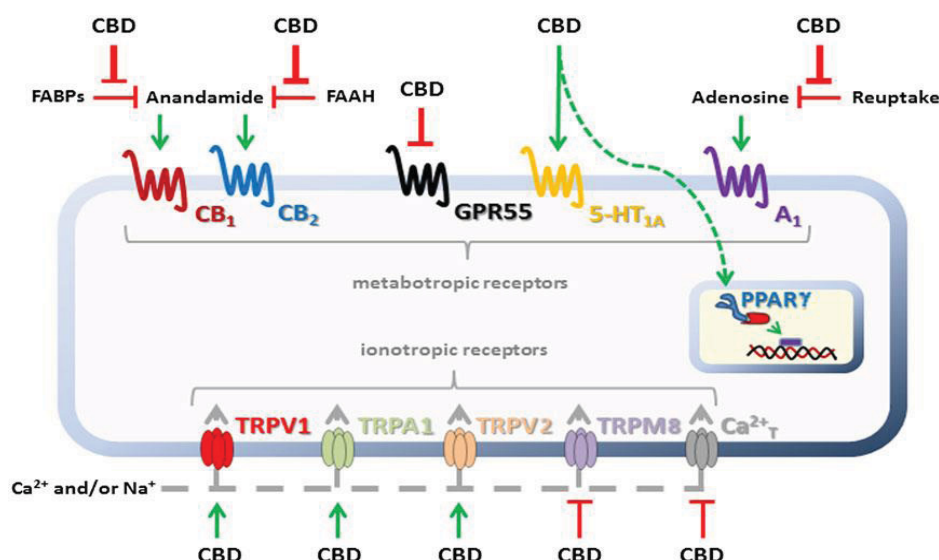
Tendo isso em vista, resultados prévios do nosso laboratório mostraram que o fitocanabinóide canabidiol (CBD) quando administrado sistemicamente, imediatamente após a sessão de condicionamento, foi capaz de prejudicar a consolidação da memória de medo contextual em dois protocolos com intensidades diferentes de choque. Quando os animais passam por um condicionamento de intensidade moderada, os animais que receberam CBD apresentam uma menor porcentagem de congelamento do que os animais que recebem veículo, quando expostos ao contexto em que foram condicionados. Adicionalmente, quando os animais passam por um condicionamento de maior intensidade, os animais que recebem veículo apresentam respostas generalizadas, caracterizadas por uma elevada porcentagem de congelamento quando expostos a um contexto neutro não-pareado, enquanto os animais que recebem CBD apresentam esse comportamento diminuído. Assim, a administração sistêmica de CBD imediatamente após um condicionamento intenso previne a generalização da memória de medo (STERN et al., 2017).

#### 1.4. O Canabidiol

Dos 66 fitocanabinoides hoje conhecidos, o CBD é o segundo mais abundantemente presente na *Cannabis sp.*, sendo uma das principais substâncias ativas da planta (MECHOULAM et al., 1970). Desprovido de efeitos psicotomiméticos (BHATTACHARYYA et al., 2009), desde os anos 70, este composto vem sendo farmacologicamente explorado, sendo os primeiros trabalhos demonstrando seu efeito anticonvulsivante em ratos e camundongos (CARLINI et al., 1973; IZQUIERDO et al., 1973). Nos anos 80, efeitos ansiolíticos produzidos pelo CBD foram observados em roedores e humanos (ZUARDI et al., 1982; GUIMARÃES et al., 1990; ZUARDI et al., 1993). Efeitos antipsicóticos, anti-inflamatórios, neuroprotetores, entre outros também foram posteriormente demonstrados (MECHOULAM et al., 2002).

Mais recentemente, trabalhos começaram a mostrar o efeito do CBD em memórias aversivas, facilitando a extinção das mesmas em ratos e humanos (BITENCOURT et al., 2008; DAS et al., 2013; DO MONTE et al., 2013; SONG et al., 2016). Também já foi demonstrado por nosso grupo que o CBD prejudica a reconsolidação de memórias de medo, com participação do CPFm, mais precisamente do pré-límbico (STERN et al., 2012; 2015) e ainda mais recente, como citado anteriormente, prejudica a consolidação de memórias de medo quando administrado sistemicamente, imediatamente após a aquisição (STERN et al., 2017).

Além de atuar em diversas regiões cerebrais como o córtex cingulado anterior, núcleos da amígdala, CPFm e substância cinzenta periaquedutal (PAG), mediando efeitos emocionais (CRIPPA et al., 2004; CAMPOS & GUIMARÃES, 2008; FUSAR-POLI et al., 2009, GOMES et al., 2012). Sabe-se que um amplo espectro de ação medeia os efeitos do CBD (IZZU et al., 2009) como mostra a figura 4. Entre os mecanismos mais conhecidos está sua capacidade de agir como agonista direto dos receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, dos PPAR gama e dos receptores de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1), além de agonista indireto dos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) e do tipo 2 (CB2; LEE et al., 2017).



**Figura 4.** Os principais alvos e potenciais mecanismos de ação do CBD. Essa droga pode ativar indiretamente os receptores CB1 e CB2 inibindo a FAAH e os transportadores da anandamida. O CBD ativa também o receptor 5-HT<sub>1A</sub> receptor, PPAR gama, TRPV1, TRPA1, TRPV2. Ainda, inibe a recaptação da adenosina e antagoniza os receptores GPR55, TRPM8 e canais de Ca<sup>2+</sup> tipo-T (LEE et al., 2017).

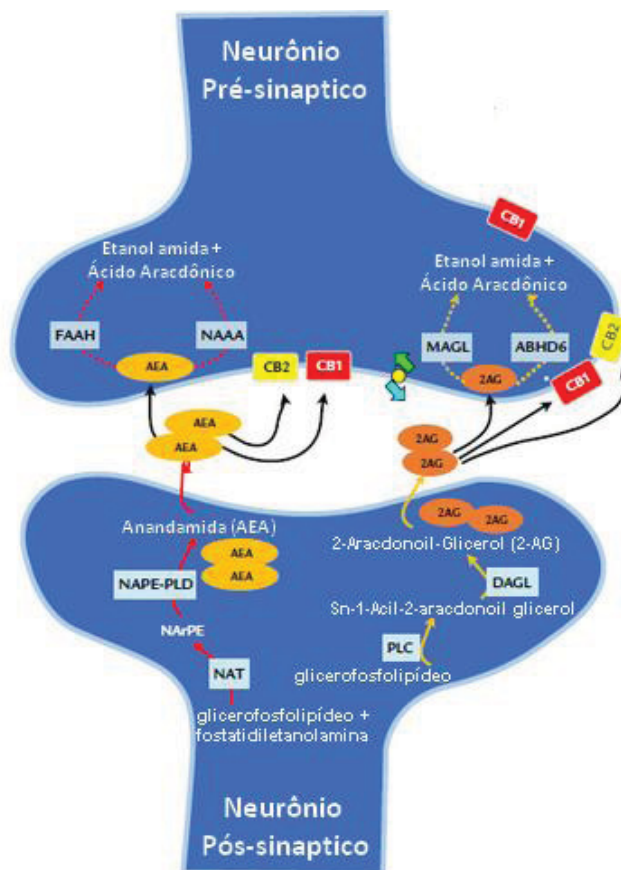
Trabalhos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o CBD aumenta os níveis de anandamida (BISOGNO et al., 2001; LEWEKE et al., 2012), possivelmente por inibição da enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, do inglês fatty acid amide hydrolase; DE PETROCELLIS et al., 2011) – que degrada a anandamida no interior dos neurônios (MCKINNEY & CRAVATT, 2005) – ou da proteína de recaptação da anandamida (ELMES et al., 2015), assim modulando o sistema endocanabinoide.

O sistema endocanabinoide, por sua vez, modula diversas funções neuronais, inclusive as relacionadas aos diferentes tipos de reações defensivas, possibilitando contrabalancear as consequências de um estímulo estressante (HOWLETT et al., 2002). Entre os principais endocanabinoides se encontram a anandamida – como foi apelidado o primeiro a ser caracterizado, o araquidonoil etanolamina (DEVANE et al., 1992) – e o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) – o segundo a ser identificado (MECHOULAM et al., 1995). Esses compostos são liberados sob demanda em situações de estresse, e assim controlam a liberação de neurotransmissores, promovendo alterações na plasticidade neural (MUNRO et al., 1993).

No sistema nervoso central, a anandamida age primariamente no receptor CB1, entretanto, também pode agir no receptor CB2, que ao contrário do CB1 – receptor mais densamente expresso no cérebro – é encontrado em menor quantidade, sendo particularmente expresso em regiões pós-sinápticas no corpo celular de neurônios e em micróglia (ONAIVI et al., 2006), agindo como um agonista parcial dos mesmos. Adicionalmente, pode ainda atuar como agonista dos receptores TRPV1 (MUNRO et al., 1993).

Sabe-se que os receptores CB1 desempenham um importante papel em diversos processos fisiológicos e patológicos, entre eles aqueles envolvidos com a memória e respostas defensivas (PACHER, et al., 2006). Sua expressão é consideravelmente alta em regiões responsáveis pelo medo e ansiedade, como o CPFm, hipocampo, amígdala, hipotálamo e PAG (HERKENHAM et al., 1991; TSOU et al., 1998).

Sendo os receptores CB1 e CB2 acoplados à proteína Gi/o, a ativação de ambos reduz a atividade da adenilato ciclase, reduzindo assim os níveis de AMPc (HOWLETT et al., 2002). Essa regulação ocorre principalmente devido a localização pré-sináptica dos receptores CB1 em neurônios glutamatérgicos ou GABAérgicos dependendo do tecido e da região encefálica (EGERTOVA et al., 1998), e devido a produção dos endocanabinoides nos neurônios pós-sinápticos, agindo como neurotransmissores retrógrados (WILSON & NICOLL, 2001). A consequência funcional é a redução da liberação de neurotransmissores induzida por despolarização (HOWLETT et al., 2002). No entanto, esses efeitos têm curta duração, devido a rápida remoção dos endocanabinoides da fenda sináptica, por difusão passiva a um gradiente de concentração, devido a sua natureza lipofílica, ou por um transportador específico (GIUFFRIDA et al., 2001), assim, no interior dos neurônios são hidrolisados como exemplificado na figura 5.



**Figura 5.** O sistema endocanabinoide: vias de síntese no neurônio pré-sináptico e degradação no neurônio pós-sináptico da anandamida e do 2-AG. NAPE-PLD, NAT, DAGL e PLC: Enzimas de síntese. FAAH, NAAA, MAGL e ABHD6: Enzimas de degradação (adaptado de de AQUINO et al., 2018).

Recentemente foi demonstrado que pacientes com TEPT apresentam uma redução nos níveis de anandamida e um aumento na expressão de receptores CB1, fato que explicaria parcialmente o aumento das reações de medo e ansiedade nesses pacientes (HILL et al., 2013; NEUMEISTER, 2013). Devido a isso uma das alternativas terapêuticas seria aumentar os níveis de anandamida cerebrais (HILL & GORZALKA, 2009; NEUMEISTER et al., 2013; TREZZA & CAMPOLONGO, 2013). Diversos estudos pré-clínicos mostram que inibidores da degradação ou da recaptação de anandamida facilitam a extinção de memórias de medo (CHHATWAL et al., 2005; PAMPLONA et al., 2008; BITENCOURT et al., 2008; MANWELL et al. 2009; ABUSH & AKIRAV, 2010; LIN et al., 2011; LARICCHIUTA et al., 2013; LISBOA et al., 2015). Ainda, administração sistêmica do inibidor seletivo da FAAH (URB597) prejudica a

consolidação da memória de medo (BUSQUETS-GARCIA, 2011; STERN et al., 2017).

Assim, o mecanismo por trás do efeito sistêmico do CBD quando administrado imediatamente após a aquisição parece estar relacionado com sua capacidade de aumentar os níveis de anandamida, já que foi visto que esse efeito depende da ativação dos receptores CB1 e CB2 (STERN et al., 2017). No entanto, como já comentado, o CBD ainda pode atuar em outros receptores, como os 5-HT<sub>1A</sub>. Diversos trabalhos em que o CBD demonstra o efeito tipo-ansiolítico também mostram que esse efeito é bloqueado pelo antagonismo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (RUSSO et al., 2005; CAMPOS & GUIMARÃES, 2008; GOMES et al., 2012; CAMPOS et al., 2012; FOGAÇA et al. 2014).

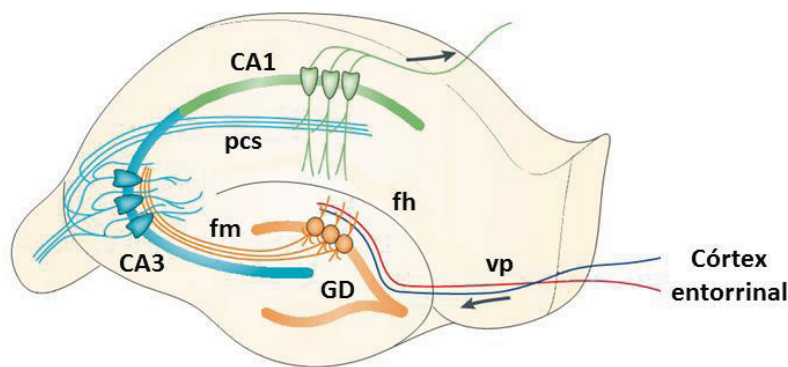
Portanto, essa diversidade de mecanismos de ação faz com que o CBD seja uma droga que talvez possa atuar em diversos momentos na janela temporal de consolidação da memória, já que esse processo recruta diversos sistemas transmissores e cascatas intracelulares que possam abranger os mecanismos dessa droga. Ainda, por mais que se saiba do envolvimento do hipocampo dorsal na consolidação das memórias, o efeito do CBD nessa região ainda precisa ser mais bem elucidado.

### **1.5. O Hipocampo Dorsal**

Tanto o hipocampo, como o CPFm e a amígdala têm sido apontados como componentes cruciais de um circuito neural relacionado à especificidade da memória e a generalização (XU & SÜDHOF, 2013; GHOSH & CHATTARJI, 2015). O hipocampo exerce controle sobre aspectos cognitivos e emocionais e além da sua função tradicional na consolidação das memórias (FANSELOW, 2000), estudos recentes indicam que alterações funcionais na porção posterior do hipocampo – homólogo ao hipocampo dorsal (HD) em roedores – teriam forte correlação com o TEPT, maior do que com transtornos de ansiedade (CHEN & ETKIN, 2013).



Nos ratos existe uma dissociação anatômica e funcional entre a sua porção ventral – homóloga ao hipocampo anterior em humanos – mais relacionada aos processos emocionais, e sua porção dorsal, responsável pelo processamento das memórias (FANSELOW & DONG, 2010). Ainda, a organização funcional do hipocampo em um circuito trissináptico (Figura 6) permite sua eficiência em receber e gerenciar as informações (NEVES et al., 2008). O córtex entorrinal, pela via perforante, envia projeções que transmitem informações sensoriais às células granulares do giro dentado, dessa região partem as fibras musgosas que enviam informações para as células piramidais da região CA3, que por sua vez, as retransmitem para a região CA1, região com alta densidade de “células de local” (*“place cells”*), que são capazes de codificar informações espaciais (O’KEEFE & NADEL, 1978).



**Figura 6.** Hipocampo dorsal e o circuito trissináptico de fluxo de informação. GD, giro dentado; vp, via perforante; fh, fístula hipocampal; fm, fibras musgosas; pcs, projeções colaterais de Schaffer (adaptado de NEVES et al., 2008).

Assim, o envolvimento do HD no processamento das memórias é evidente, principalmente durante a consolidação (O’KEEFE & NADEL, 1978; IZQUIERDO & MEDINA, 1997;), em especial aquelas com componentes espaciais, como o condicionamento de medo ao contexto (FANSELOW, 2000). É possível estimar sua participação por meio da expressão de proteínas, como a Arc que tem sua expressão frente a eventos que levam à plasticidade neuronal (KORB & FINKBEINER, 2011; SHEPHERD & BEAR, 2011). Portanto, a expressão aumentada de Arc no HD após o aprendizado reforça a participação dessa estrutura na consolidação das memórias (GUZOWSKI et al., 2000; CZERNIAWSKI et al., 2011).



Adicionalmente, devido às projeções vindas do CPFm, hipocampo ventral e amígdala (VERTES, 2006; FANSELOW & DONG, 2010), a capacidade de eventos emocionais potencializarem as memórias de medo dependentes do hipocampo é evidente (MALIN & MCGAUGH, 2006; HERMANS et al., 2014).

Ainda, como citado anteriormente, o hipocampo é uma das regiões em que os receptores CB1 e CB2 são mais expressos (AMERI, 1999; HAMPSON & DEADWYLER, 1999). Dessa forma, já foi demonstrado que esses receptores no hipocampo participam da consolidação da memória aversiva (DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2008; SHOSHAN & AKIRAV, 2017; NASEHI et al., 2017). Além disso, o trabalho recente do nosso grupo mostra que o efeito sistêmico do CBD na consolidação da memória depende dos receptores CB1 e CB2 do HD (STERN et al., 2017), sugerindo um papel do sistema endocanabinoide hipocampal no efeito do CBD na modulação das memórias aversivas, no entanto, ainda não se sabe se em tempos posteriores da janela de consolidação da memória o CBD pode ter um efeito, e ainda quais mecanismos poderiam mediar esse efeito no HD.

## **2. Hipótese**

Tendo em vista que o CBD é uma droga com um amplo espectro de ação, capaz de prejudicar a consolidação de uma memória de medo generalizada quando administrada sistemicamente, imediatamente após a aquisição, e que o hipocampo dorsal desempenha um papel fundamental na consolidação e especificidade de memórias de medo contextuais, a hipótese do presente trabalho é que o canabidiol, quando administrado no hipocampo dorsal, pode ser capaz de prejudicar a consolidação de uma memória de medo mesmo em tempos posteriores a sua aquisição na janela temporal de consolidação.

## **3. Objetivo geral**

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do canabidiol quando administrado no hipocampo dorsal de ratos na consolidação de uma memória de medo generalizada em diversos tempos dentro da janela temporal de consolidação e ainda avaliar os mecanismos de ação que medeiam seus efeitos.

### **3.1. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do CBD no HD na consolidação e generalização da memória de medo quando administrado imediatamente após a aquisição;
- Avaliar o efeito do CBD no HD na consolidação e generalização da memória de medo quando administrado 30 min após a aquisição;
- Avaliar o efeito do CBD no HD na consolidação e generalização da memória de medo quando administrado 1 hora após a aquisição;
- Avaliar o efeito do CBD no HD na consolidação e generalização da memória de medo quando administrado 3 horas após a aquisição;
- Avaliar o mecanismo de ação do CBD – papel dos receptores CB1, CB2 e 5-HT<sub>1A</sub> – imediatamente após a aquisição;
- Avaliar o efeito da inibição seletiva da FAAH no HD na consolidação e generalização da memória de medo imediatamente após a aquisição;

- Avaliar o mecanismo de ação do CBD – papel dos receptores CB1, CB2 e 5-HT<sub>1A</sub> – 1 hora após a aquisição;
- Avaliar a expressão da proteína Arc no HD imediatamente e 1 hora após o condicionamento.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Animais**

Um total de 254 ratos *Wistar* machos, com três meses de idade, pesando entre 270 e 320 g, foram obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram alojados em grupos de quatro ou cinco em caixas de polipropileno medindo 60 x 40 x 25 cm e mantidos no biotério sob condições de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e iluminação (ciclo de 12 h, luzes acesas às 7 h) controladas e livres acesso a água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê local para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (CEUA # 1048), em conformidade com a legislação brasileira. Além disso, todas as tentativas foram feitas para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

### **4.2. Drogas**

Foram utilizadas as seguintes drogas: CBD (Phytoplant, Espanha; 10-30 pmol ou 10 mg/kg), AM251 (antagonista dos receptores CB1; Tocris, EUA; 0,5 nmol), AM630 (antagonista dos receptores CB2; Tocris, EUA; 0,1 nmol), WAY100635 (antagonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>; Sigma-Aldrich, EUA; 0,14 nmol) e URB597 (inibidor seletivo da FAAH; Tocris, EUA; 10 pmol). O CBD, AM251, AM630 e URB597 foram dissolvidos em NaCl a 0,9% contendo apenas 5,0% de polioxietilenosorbitano monooleato (Tween® 80, Sigma-Aldrich, EUA). O WAY100635 foi dissolvido em NaCl a 0,9%. A seleção das doses foi baseada em experimentos pilotos e trabalhos anteriores, onde o CBD interferiu na consolidação ou reconsolidação de memórias contextuais de medo (STERN et al. 2012; 2015; 2017; GAZARINI et al. 2014); e em que o AM251 e AM630 não produziram efeito por si só, mas impediram os efeitos comportamentais do CBD após a injeção sistêmica (STERN et al., 2017). Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes da utilização e injetadas no HD num volume de 0,5 µL/lado ou intraperitonealmente (i.p.) num volume de 1,0 ml/kg.

### **4.3. Cirurgia estereotáxica**

Os animais foram anestesiados com quetamina 75 mg/kg e xilasina 25 mg/kg e colocados no aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA), com as cabeças fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. A limpeza do campo cirúrgico foi feita com uma solução contendo iodo a 2% e na região da incisão foi administrado o anestésico local cloridrato de lidocaína 3% associado ao vasoconstritor noradrenalina (1:50000). Uma incisão longitudinal foi realizada após alguns minutos para expor a calvária e o perióstio foi removido por raspagem. Na sequência, dois orifícios foram perfurados, com uma broca odontológica acoplada a um mini-motor de suspensão, para a fixação de dois micro-parafusos de aço inoxidável, que serviram de âncora para a prótese de acrílico disposta no crânio do animal. Outros dois orifícios foram perfurados para a introdução de duas cânulas-guia dirigidas à região do HD.

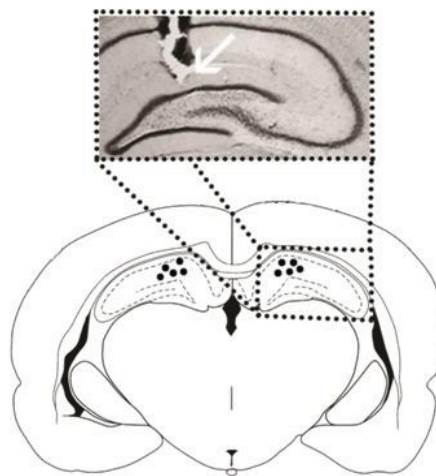
As cânulas-guia, confeccionadas a partir de agulhas de injeção hipodérmicas (extensão = 9 mm; diâmetro externo = 0,7 mm; diâmetro interno = 0,4 mm), foram implantadas bilateralmente acima da região CA1 do HD conforme coordenadas de Paxinos e Watson (2009): 3,8 mm posterior ao Bregma,  $\pm$  2,5 mm relativo ao eixo lateral e - 1,8 mm relativo ao eixo dorso-ventral, e através delas que as drogas foram administradas na sessão experimental. As cânulas-guia foram fixadas na calota craniana por meio de uma resina acrílica autopolimerizável. Um mandril de aço inoxidável foi colocado em cada uma das cânulas-guia para evitar o entupimento das mesmas. Após a cirurgia, os ratos receberam 0,4 ml de ibuprofeno via oral (20 mg/ml, Natulab, Brasil) e retornaram para ao biotério.

### **4.4. Microinfusão de drogas**

Após dez dias da cirurgia ocorreu o início dos experimentos comportamentais. Em diferentes tempos após a aquisição da memória os animais receberam uma infusão bilateral com agulhas gengivais (diâmetro externo = 0,3 mm) introduzidas através das cânulas guia até que suas pontas estivessem 1,5 mm abaixo da extremidade da cânula. Um cateter de polietileno

foi interposto entre a extremidade superior das agulhas dentárias e as microseringas. O deslocamento de uma bolha de ar dentro do polietileno foi usado para monitorar o fluxo de drogas. Durante 1 minuto, 0,5  $\mu$ L/lado de veículo ou droga foi injetado usando duas micro-seringas de 10  $\mu$ L (Hamilton, EUA) conectadas a uma bomba de infusão (Insight, Brasil). Nos casos em que o pré-tratamento foi administrado, a segunda infusão foi realizada 10 minutos após a primeira. As agulhas foram removidas 30 s após o término das injeções.

Após o final de cada experimento, os ratos foram anestesiados intraperitonealmente como já descrito. Azul de Evans (0,5  $\mu$ L/lado) foi injetado através das cânulas-guia para avaliação subsequente do local de infusão. O encéfalo foi removido e imerso em solução de formalina a 10%. Cortes do cérebro (100  $\mu$ m de espessura) foram obtidos num vibratomo (Leica, Alemanha) e o local da injeção foi determinado. Os animais foram incluídos na análise quando ambos os lados do HD foram marcados por Azul de Evans, como representado na figura 7.



**Figura 7.** Sítio de infusão representativo e diagrama esquemático mostrando o local de infusão de drogas no HD (círculos preenchidos; STERN et al., 2017).

#### **4.5. Condicionamento de medo ao contexto**

Cada bloco de experimentos foi realizado no mesmo período do dia, entre 13 e 17 horas. Todos os animais foram ambientados à uma sala adjacente a sala de experimento por pelo menos 30 min antes de cada sessão

experimental. As salas de experimentação foram mantidas com temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e luminosidade de 70 lux controladas durante o experimento.

A sessão de condicionamento de medo contextual foi realizada em uma caixa de alumínio, com a parede frontal e a tampa superior de acrílico transparente (26 x 31.5 x 21 cm; Insight, Brasil), denominada Contexto A. O piso de barras de metal inoxidável (3 mm de diâmetro e afastadas 0,9 mm centro a centro) é conectado a uma fonte de choque. Uma segunda caixa (33 x 34 x 26 cm), feita de acrílico transparente com uma tampa preta – afim de possuir pistas diferentes do contexto pareado – foi utilizada para se avaliar a especificidade da memória, sendo denominada Contexto B.

Em todos os experimentos, primeiramente os animais foram submetidos à sessão de familiarização, na qual os animais foram colocados no Contexto A por 3 minutos para livre exploração, e em seguida retornam à caixa moradia. Após 24 horas os animais foram submetidos à sessão de condicionamento, assim foram colocados novamente no Contexto A e receberam, após 30 s iniciais, o estímulo incondicionado [3 choques elétricos nas patas de 1,0 mA (nos experimentos de 1 a 4) ou 0,8 mA (no experimento 5), 60 Hz, por 3 s, com 30 s de intervalo]. Após o último choque, os ratos permaneceram por mais 30 s na caixa. As intensidades de choque foram baseadas em resultados prévios do grupo, que mostraram ser capazes de induzir expressões generalizadas de medo em animais que receberam veículo tanto intra-HD ou i.p. em animais sem cirurgia (STERN et al., 2017).

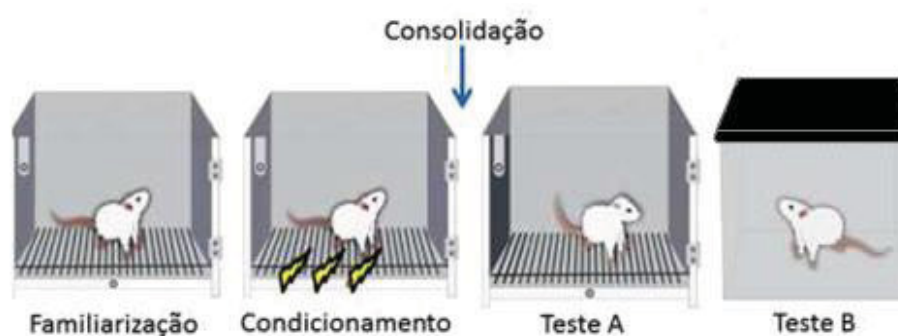
No experimento 1, em grupos independentes de animais, o tratamento (veículo ou CBD) ocorreu em diferentes momentos - imediatamente (1A), 30 minutos (1B), 1 hora (1C) ou 3 horas (1D) após o condicionamento. No experimento 2, a infusão do veículo ou dos antagonistas foi imediatamente após o condicionamento e, 10 minutos após, foi feita a segunda infusão com veículo ou CBD. No experimento 3, os animais receberam o URB597 ou veículo imediatamente após o condicionamento. No experimento 4, a infusão do veículo ou dos antagonistas foi feita 1 hora após o condicionamento e, 10 minutos após, os animais receberam a segunda infusão com veículo ou CBD.



No experimento 5, os animais receberam uma administração sistêmica de veículo ou CBD (10 mg/kg) imediatamente ou 1 hora após o condicionamento.

O acesso aos efeitos do tratamento na memória de medo foi feito nos dias seguintes re-expondo o animal ao Contexto A pareado, na ausência de choque, por 3 min, sendo essa a sessão de evocação da memória (Teste A1). Ainda os animais foram expostos 24 horas após, ao contexto B não-pareado. (Teste B1), como esquematizado na figura 8. Nos experimentos 1A-D, Testes A2 e B2 foram feitos sete dias após os Testes A1 e B1, respectivamente, para avaliar se os efeitos do CBD seriam duradouros.

O comportamento de congelamento foi registrado como parâmetro de retenção da memória de medo. O tempo de congelamento foi quantificado em segundos e expresso em porcentagem do tempo total de sessão.



**Figura 8.** Protocolo experimental do modelo de condicionamento de medo ao contexto. O esquema demonstra cada dia de protocolo, sendo as sessões espaçadas por 24 horas. A familiarização, condicionamento e Teste A foram realizados no contexto condicionado ao choque (Contexto A). O Teste B foi utilizado para avaliar a generalização do medo, caracterizada pela expressão de congelamento em um ambiente não condicionado ao choque. A seta indica a etapa da memória em que serão feitas as interferências farmacológicas.

#### **4.6. Avaliação da expressão de Arc por Western Blotting**

Imediatamente ou 1 hora após o condicionamento, os ratos receberam CBD (10 mg/kg) ou veículo i.p. e depois de 90 minutos foram decapitados. O HD foi rapidamente removido e armazenado no freezer a -80 °C. O HD de um grupo de animais naïve também foi removido para se comparar a expressão basal da proteína Arc.

Para extração de proteínas, os tecidos foram homogeneizados em 0,6 mL de tampão de solubilização [EDTA 10 mM, Tris 100 mM pH 7,5, 0,2% de cocktail inibidor de protease (PROMEGA)]. A seguir, as amostras foram adicionadas de 60 µL de Triton X-100 10% e deixadas no gelo durante 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas (13000 rpm por 20 minutos a 4 °C) e o sobrenadante foi recolhido (400 µL) e adicionado de 100 µL de tampão de *Laemmli* [azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 10%, dithiothreitol (DTT) 100 mM]. As amostras foram aquecidas em água fervente por 5 minutos e estocadas a -20° C. A dosagem da concentração de proteína total foi determinada colorimetricamente (Bradford Protein Assay, BIO-RAD).

As amostras foram novamente aquecidas em água fervente por 5 minutos e o volume correspondente a 100 µg de proteína foi aplicado em *SDS-PAGE*. Cada gel continha 10 µL de marcador (*Kaleidoscope Prestained Standards*, BIO-RAD) com peso molecular compatível ao das proteínas a serem quantificadas. As proteínas foram separadas por eletroforese, a 40 V nos primeiros 30 minutos e a 120 V até o final da corrida. As proteínas foram transferidas por 90 minutos para a membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL*, GE Healthcare Life Sciences) a 100 V, em transferência úmida. A seguir, as membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução basal (Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM e Tween® 20 0,025%) com BSA 3% sob agitação, com a finalidade de minimizar a ligação do anticorpo a sítios não-específicos.

As membranas foram lavadas com solução basal (3 vezes de 10 minutos), sob agitação e, em seguida, incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-Arc (1:500; sc-17839 - Santa Cruz Biotechnologies, EUA) diluído em solução basal com BSA 3%. A seguir, as membranas foram novamente lavadas com solução basal (3 vezes de 10 minutos) e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-camundongo (1:5000; sc-516102 - Santa Cruz Biotechnologies, EUA) diluído em solução basal mais BSA 3%. As membranas foram incubadas com reagente quimioluminescente (*Westen ECL Substrate*, BIO-RAD) e foram expostas ao fotodocumentador (Amersham™ Imager 600, GE Healthcare Life Sciences) para revelação.

O *stripping* foi realizado para extrair os anticorpos anteriormente ligados e permitir a quantificação das proteínas  $\alpha$ -tubulina com o objetivo de normalizar a quantidade de proteína carregada no gel. Neste procedimento, as membranas foram incubadas com solução de *stripping* ( $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris 62,5 mM pH 6,7) a 48 °C por 30 minutos e agitação a cada 10 minutos. A seguir, as etapas de bloqueio, incubação e detecção foram repetidas conforme descrição acima, utilizando agora o anticorpo primário anti- $\alpha$ -tubulina (1:1000; sc-134237 - Santa Cruz Biotechnologies, USA).

A análise quantitativa foi realizada por densitometria utilizando o software *Scion Image Beta 4.03 for Windows* (Scion Corporation, EUA). As intensidades foram normalizadas para valores correspondentes para expressão de  $\alpha$ -tubulina e expressas com valor relativo à expressão basal (expressão do grupo naïve).

#### **4.7. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (EPM). Depois de assegurar a distribuição de normalidade, os tempos de congelamento registrados nos Contextos A e B dos experimentos comportamentais e a relação Arc/ $\alpha$ -tubulina do Western Blotting foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, de duas vias ou de medidas repetidas. Quando a ANOVA revelou uma interação significativa entre as variáveis independentes em estudo, os valores de F dos seus principais efeitos foram omitidos. O teste de Newman-Keuls foi usado para comparações *post-hoc*. O nível de significância estatística foi estabelecido em  $P < 0,05$ . Para a análise estatística utilizou-se Statistica 12 (StatSoft, EUA), e GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism, EUA) foi utilizado para a representação gráfica.

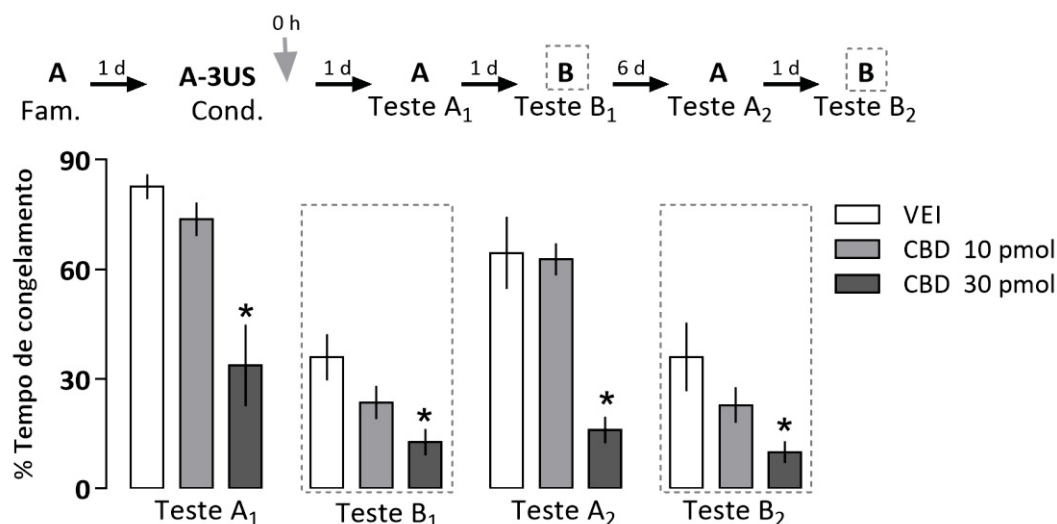
## 5. Resultados

### 5.1. Experimento 1: A infusão de CBD no HD imediatamente e uma hora após o condicionamento prejudicou a consolidação e generalização da memória do medo

Para investigar se a infusão de CBD no HD poderia interferir na consolidação da memória de medo contextual, 21 animais tiveram o Contexto A pareado com três choques de 1,0 mA e depois foram alocados aleatoriamente em três grupos ( $n=7/\text{grupo}$ ) com base na infusão intra-HD de CBD (10 ou 30 pmol/0,5  $\mu\text{l/lado}$ ) ou veículo imediatamente após o condicionamento.

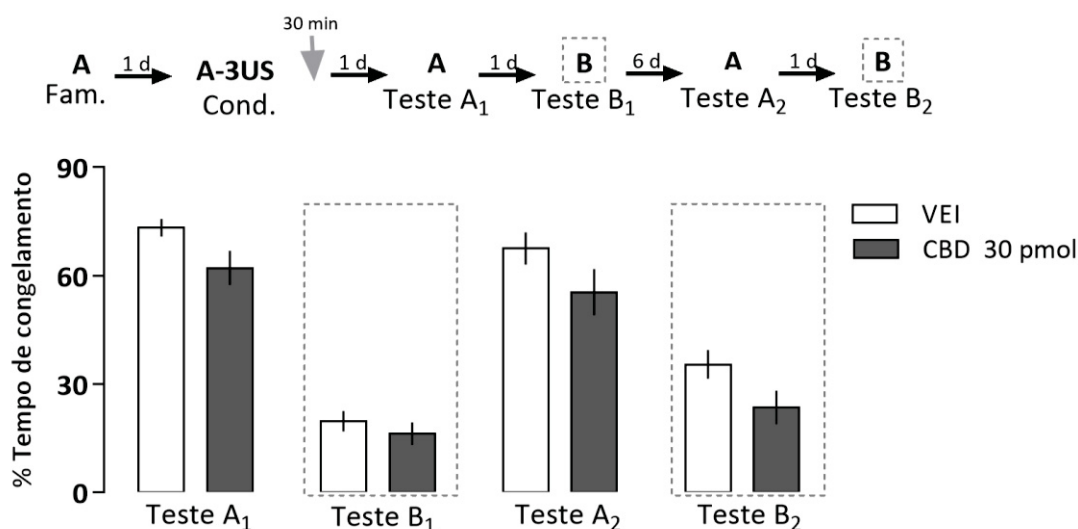
Em relação ao Contexto A, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento [ $F(2,18) = 20,1$ ;  $P = 0,00002$ ] e da re-exposição ao contexto [ $F(1,18) = 18,1$ ;  $P = 0,0003$ ]. A interação entre o tratamento e a exposição ao Contexto A não foi estatisticamente significativa [ $F(2,18) = 0,8$ ;  $P = 0,45$ ]. Como mostrado na figura 9, o grupo tratado com CBD 30 pmol apresentou estatisticamente menos tempo de congelamento que o controle durante os testes A1 e A2, sugerindo que quando infundido no HD, o CBD prejudica a consolidação de uma memória de medo intensa.

Em relação ao contexto B, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento [ $F(2,18) = 5,6$ ;  $P = 0,01$ ]. Como mostrado na figura 9, o grupo tratado com CBD 30 pmol apresentou menos tempo de congelamento que o controle durante os testes B1 e B2, sugerindo que a infusão de CBD no HD prejudica a generalização da memória. O fator re-exposição ao contexto ou a interação entre o tratamento e a exposição ao Contexto B não foram estatisticamente significantes [ $F(1,18) = 0,14$ ;  $P = 0,71$  e  $F(2,18) = 0,08$ ;  $P = 0,92$ , respectivamente].



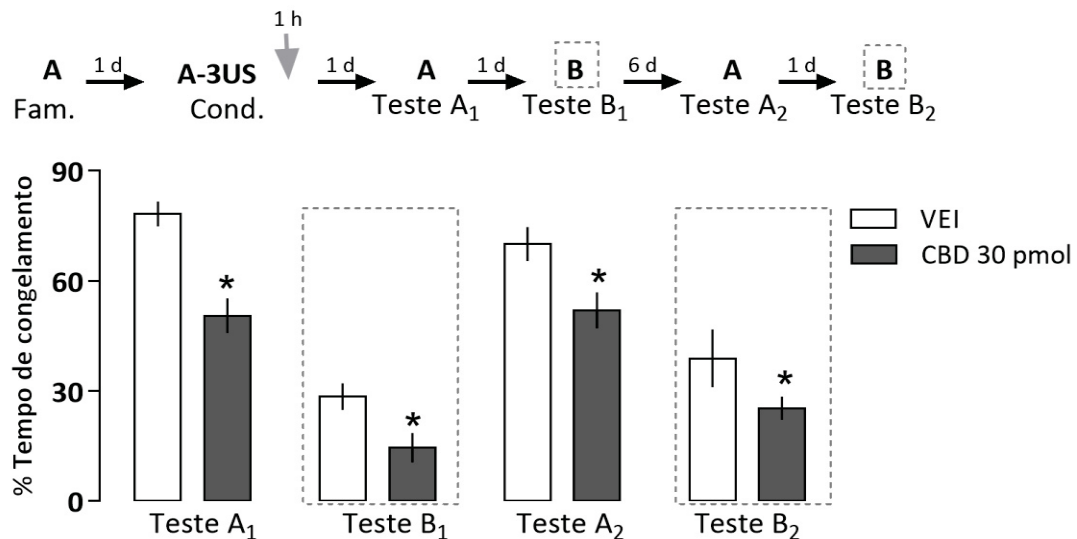
**Figura 9.** O CBD infundido no HD imediatamente após o condicionamento prejudicou a consolidação e generalização da memória do medo. O grupo que recebeu CBD (30 pmol/0,5  $\mu$ L/lado) imediatamente após o condicionamento apresentou menos tempo de congelamento que o controle durante o Teste A<sub>1</sub> e Teste A<sub>2</sub>. O tratamento com CBD também reduziu a expressão de congelamento no Teste B<sub>1</sub> e Teste B<sub>2</sub>. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=7/grupo). A seta indica o tempo de injeção de drogas após o condicionamento. Os \* indicam a significância (P < 0,05) do grupo controle na mesma sessão.

Para investigar o efeito do CBD em tempos posteriores da janela temporal de consolidação da memória, 44 ratos foram condicionados e receberam a infusão da dose efetiva de CBD (30 pmol/0,5  $\mu$ L/lado) ou veículo 30 minutos (n=6-9/grupo), 1 hora (n=9-11/grupo) ou 3 horas (n=4-5/grupo) após o condicionamento. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que 30 minutos após o condicionamento (Figura 10) não houve efeito do tratamento no tempo de congelamento tanto no Contexto A como no Contexto B [ $F(1,13) = 2,90$ ;  $P = 0,11$  e  $F(1,13) = 3,7$ ;  $P = 0,77$ , respectivamente], na re-exposição ao Contexto A ou ao Contexto B [ $F(1,13) = 3,90$ ;  $P = 0,70$  e  $F(1,13) = 8,6$ ;  $P = 0,01$ , respectivamente] nem interação entre o tratamento e a re-exposição ao Contexto A ou ao Contexto B [ $F(1,13) = 0,02$ ;  $P = 0,90$  e  $F(1,13) = 1,20$ ;  $P = 0,30$ , respectivamente], sugerindo que, 30 minutos após o condicionamento de medo, a infusão de CBD no HD não altera a consolidação da memória.



**Figura 10.** O CBD infundido no HD 30 min após o condicionamento não mostrou nenhum efeito significativo na consolidação e generalização da memória do medo. O tratamento com CBD 30 pmol, 30 min após o condicionamento, não induziu mudanças no tempo de congelamento durante o Teste A<sub>1</sub>, Teste A<sub>2</sub>, Teste B<sub>1</sub> e Teste B<sub>2</sub>. Os valores são expressos como média ± EPM (n=6-9/grupo). A seta indica o tempo de injeção de drogas após o condicionamento.

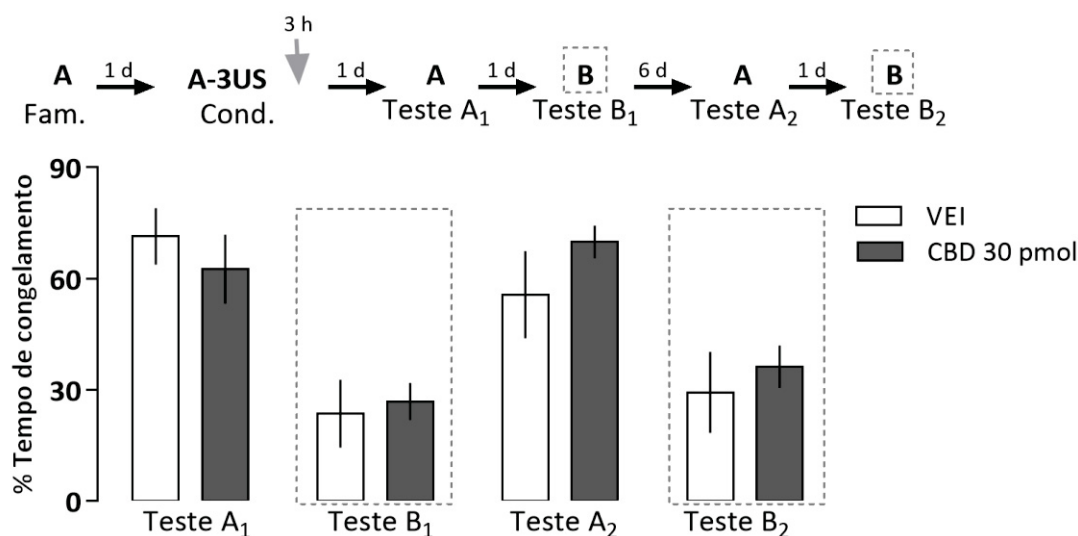
No entanto, uma hora após o condicionamento, em relação ao Contexto A, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento [ $F(1,18) = 19,5$ ;  $P = 0,00003$ ]. Como mostrado na Figura 11, o grupo tratado com CBD 30 pmol apresentou estatisticamente menos tempo de congelamento que o controle durante os testes A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>. Não houve efeito da re-exposição ao Contexto A ou interação entre o tratamento e a re-exposição ao Contexto A [ $F(1,18) = 0,7$ ;  $P = 0,42$  e  $F(1,18) = 3,11$ ;  $P = 0,09$ , respectivamente]. Em relação ao Contexto B, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo no tratamento no tempo de congelamento [ $F(1,18) = 5,40$ ;  $P = 0,03$ ] e na re-exposição ao Contexto B [ $F(1,18) = 6,82$ ;  $P = 0,02$ ]. Como mostrado na figura 11, o grupo tratado com CBD 30 pmol apresentou estatisticamente menos tempo de congelamento que o controle durante os testes B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. A interação entre tratamento e a exposição ao Contexto B não foi estatisticamente significativa [ $F(1,18) = 0,00003$ ;  $P = 0,99$ ]. Esses resultados sugerem que, após 1 hora, a infusão de CBD no HD prejudica a consolidação e a generalização da memória.



**Figura 11.** O CBD infundido no HD 1 hora após o condicionamento prejudicou a consolidação e generalização da memória do medo. O grupo que recebeu CBD (30 pmol/0,5 µL/lado) 1 hora após o condicionamento apresentou menos tempo de congelamento que o controle durante o Teste A<sub>1</sub> e Teste A<sub>2</sub>. O tratamento com CBD também reduziu a expressão de congelamento no Teste B<sub>1</sub> e Teste B<sub>2</sub>. Os valores são expressos como média ± EPM (n=9-11/grupo). A seta indica o tempo de injeção de drogas após o condicionamento. Os \* indicam a significância (P < 0,05) do grupo controle na mesma sessão.

Após 3 horas (Figura 12), a ANOVA de medidas repetidas não mostrou nenhum efeito do tratamento no tempo de congelamento em relação ao Contexto A ou ao Contexto B [ $F(1,7) = 0,07$ ;  $P = 0,8$  e  $F(1,7) = 0,3$ ;  $P = 0,62$ , respectivamente], na re-exposição ao Contexto A ou ao Contexto B [ $F(1,7) = 0,5$ ;  $P = 0,50$  e  $F(1,7) = 3,0$ ;  $P = 0,12$ , respectivamente], nem interação entre o tratamento e a re-exposição ao Contexto A ou ao Contexto B [ $F(1,7) = 3,6$ ;  $P = 0,1$  e  $F(1,7) = 0,17$ ;  $P = 0,70$ , respectivamente], como representado na figura 12, sugerindo uma falta de efeito do CBD às 3 horas na consolidação da memória.





**Figura 12.** O CBD infundido no HD 3 horas após o condicionamento não mostrou nenhum efeito significativo na consolidação e generalização da memória do medo. O tratamento com CBD 30 pmol, 3 horas após o condicionamento, não induziu mudanças no tempo de congelamento durante o Teste A<sub>1</sub>, Teste A<sub>2</sub>, Teste B<sub>1</sub> e Teste B<sub>2</sub>. Os valores são expressos como média ± EPM (n=4-5/grupo). A seta indica o tempo de injeção de drogas após o condicionamento.

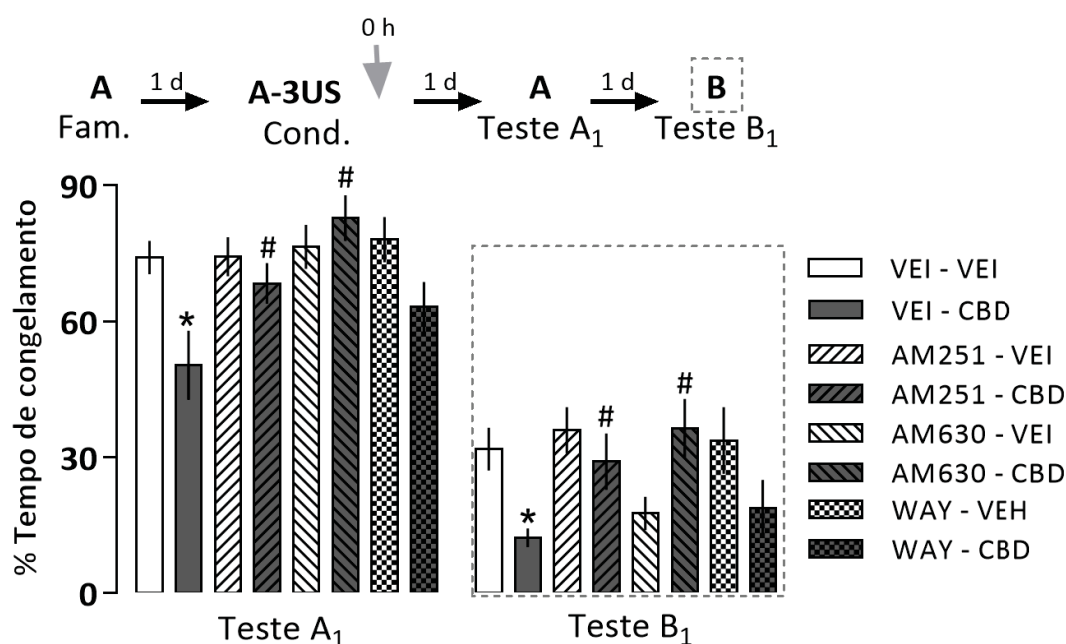
Juntos, esses resultados sugerem que, imediatamente e 1 hora após o condicionamento ao medo, mecanismos envolvidos no efeito do CBD são recrutados no HD para consolidação da memória.

## 5.2. Experimento 2: O efeito na consolidação e generalização da memória da administração de CBD no HD, imediatamente após o condicionamento, depende dos receptores CB1 e CB2

Para investigar o mecanismo de ação dos efeitos do CBD imediatamente após o condicionamento, 77 ratos foram condicionados (n=8-11/grupo) e receberam a infusão de veículo, AM251 (antagonista do receptor CB1; 0,5 nmol/0,5 µL/lado), AM630 (antagonista do receptor CB2, 0,1 nmol/0,5 µL/lado) ou WAY100635 (antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>; 0,14 nmol/0,5 µL/lado) e após 10 minutos cada grupo foi dividido em grupos que receberam veículo ou CBD (30 pmol/0,5 µL/lado).

A ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre os fatores pré-tratamento X tratamento durante a re-exposição ao Contexto A [ $F(3,69) = 3,00$ ;

$P = 0,03$ ]. Como mostrado na Figura 13, os animais tratados com CBD apresentaram menor tempo de congelamento que os controles. No entanto, o pré-tratamento com AM251 ou AM630 preveniu este efeito, sugerindo um papel dos receptores CB1 e CB2 no efeito de prejudicar a consolidação de memória induzido por CBD. O pré-tratamento com WAY100635 reverteu parcialmente o efeito CBD. Quando expostos ao Teste B, a ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre os fatores pré-tratamento X tratamento [ $F(3,69) = 4,60$ ;  $P = 0,005$ ]. Como mostrado na Figura 9, os animais tratados com CBD apresentaram menor tempo de congelamento que os controles. Este efeito foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 ou AM630, no entanto, o pré-tratamento com WAY100635 não aboliu o efeito do CBD, confirmando a participação dos receptores CB1 e CB2 no efeito CBD na generalização da memória.

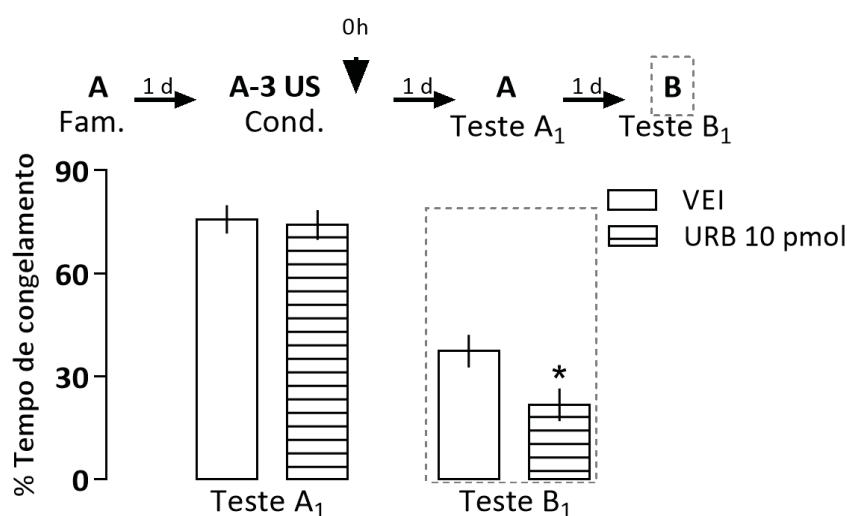


**Figura 13:** O efeito do CBD imediatamente após o condicionamento depende dos receptores CB1 e CB2, mas não dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. O grupo que recebeu CBD 30 pmol apresentou menor tempo de congelamento que o controle durante o Teste A1 e Teste B1. O pré-tratamento com AM251 (antagonista CB1 - 0,5 nmol/0,5 µL/lado) e AM630 (antagonista CB2 - 0,1 nmol/0,5 µL/lado), mas não WAY100635 (antagonista 5-HT<sub>1A</sub> - 0,14 nmol/0,5 µL/lado), preveniu esse efeito. Os valores são expressos como média ± EPM (n=8-11/grupo). A seta indica o tempo de injeção de drogas após o condicionamento. Os \* indicam a significância ( $P < 0,05$ ) do grupo controle (VEI - VEI) na sessão. Os # indicam a significância ( $P < 0,05$ ) do grupo VEI - CBD na mesma sessão.

### 5.3. Experimento 3: A infusão de URB597 no HD imediatamente após o condicionamento prejudicou a generalização da memória do medo

Para investigar se a inibição seletiva da FAAH no HD imediatamente após a aquisição poderia também interferir na consolidação da memória, 18 animais foram condicionados e então alocados aleatoriamente em dois grupos (n=8-10/grupo) com base na infusão de URB597 (inibidor seletivo da FAAH; 10 pmol/0,5 µl/lado) ou veículo.

A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento durante o Teste B1 [ $F(1,16) = 5,3$ ;  $P = 0,04$ ], mas não no Teste A1 [ $F(1,16) = 0,52$ ;  $P = 0,48$ ]. Como mostrado na Figura 14, os animais de ambos os grupos apresentaram uma quantidade similar de tempo de congelamento durante o Teste A1, mas os animais tratados com URB597 expressaram estatisticamente menos tempo de congelamento do que os controles durante o Teste B1. Assim, o URB597 prejudica especificamente a generalização da memória.

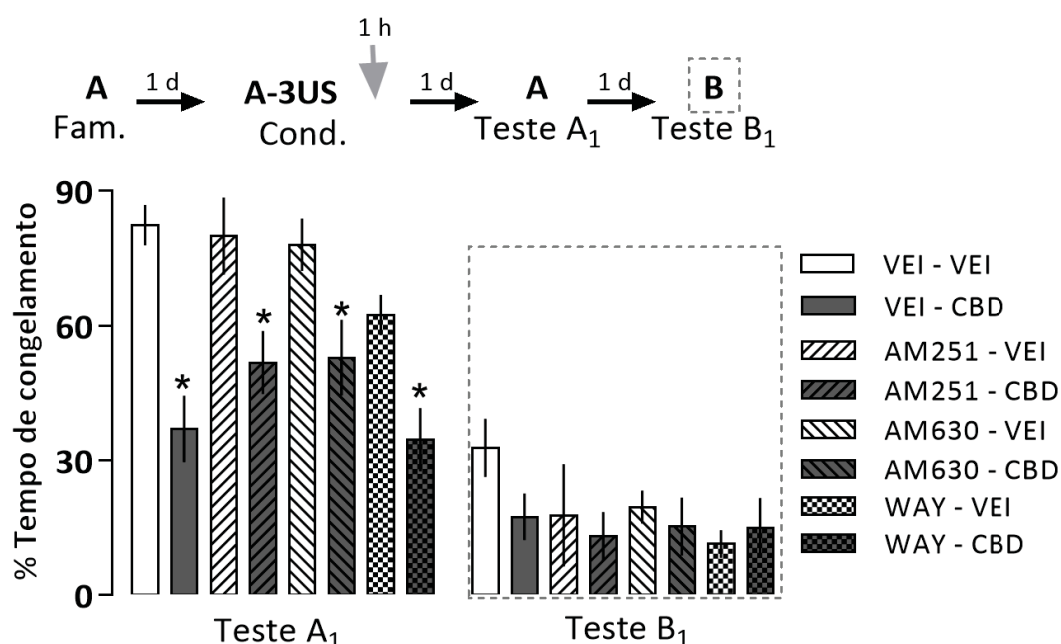


**Figura 14.** A inibição seletiva da FAAH pelo URB597 infundido no HD imediatamente após o condicionamento prejudicou especificamente a generalização da memória do medo. O grupo que recebeu URB597 (10 pmol/0,5 µL/lado) imediatamente após o condicionamento apresentou menos tempo de congelamento que o controle durante o Teste B1. Nenhuma diferença entre os grupos foi observada no teste A1. Os valores são expressos como média ± EPM (n=8-10/grupo). A seta indica o tempo de injeção de drogas após o condicionamento. O \* indica a significância ( $P < 0,05$ ) do grupo controle na mesma sessão.

#### **5.4. Experimento 4: O efeito na consolidação e generalização da memória da administração de CBD no HD 1 hora após o condicionamento é independente nos receptores CB1, CB2 e 5-HT<sub>1A</sub>.**

Para avaliar o mecanismo de ação do CBD 1 hora após o condicionamento de medo, 54 ratos foram condicionados (n=4-11/grupo) e receberam a infusão de veículo, AM251 (antagonista do receptor CB1; 0,5 nmol/0,5 µL/lado), AM630 (antagonista do receptor CB2; 0,1 nmol/0,5 µL/lado) ou WAY100635 (antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>; 0,14 nmol/0,5 µL/lado) 1 hora após o condicionamento de medo e 10 minutos depois cada grupo foi dividido em grupos que receberam veículo ou CBD (30 pmol/0,5 µL/lado).

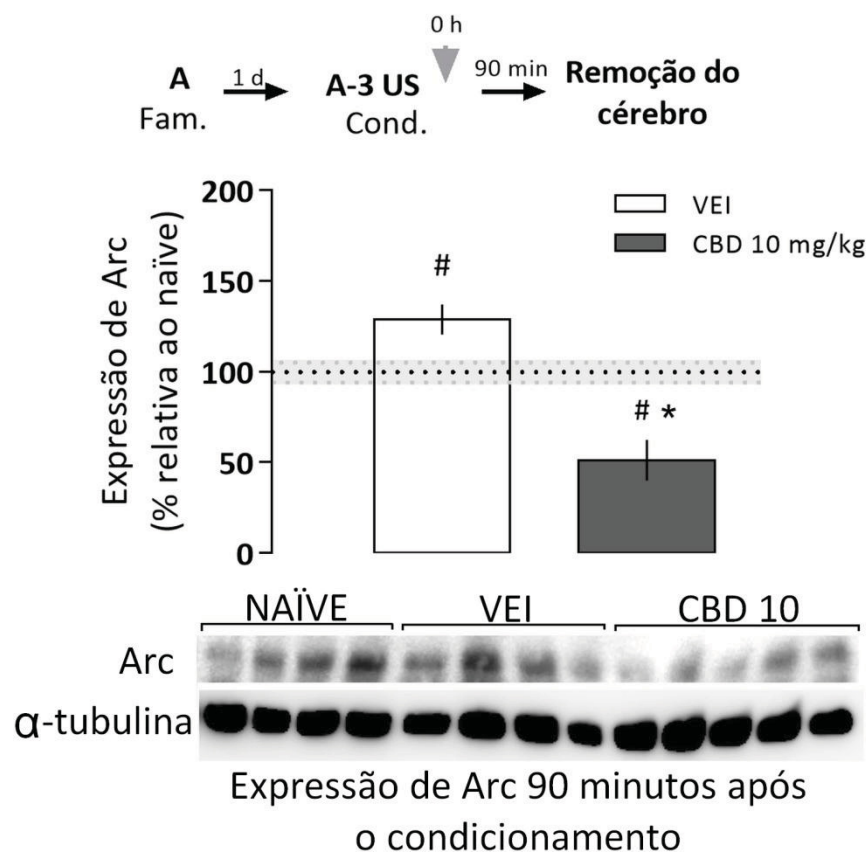
A ANOVA de duas vias mostrou um efeito do pré-tratamento [ $F(3,46) = 2,70$ ;  $P = 0,04$ ] e um efeito do tratamento durante a re-exposição ao Contexto A [ $F(1,46) = 33,24$ ;  $P = 0,000001$ ]. A interação entre os fatores não foi significativa [ $F(3,46) = 0,75$ ;  $P = 0,53$ ]. Como mostrado na figura 11, os animais tratados com CBD apresentaram menor tempo de congelamento que os controles. No entanto, o pré-tratamento com AM251, AM630 ou WAY100635 não preveniu o efeito do CBD, sugerindo que 1 hora após o condicionamento pelo medo, o CBD prejudica a consolidação da memória do medo através de um mecanismo de ação diferente. Quando expostos ao Teste B, a ANOVA de duas vias não mostrou nenhum efeito do pré-tratamento [ $F(3,46) = 1,50$ ;  $P = 0,35$ ], do tratamento [ $F(1,46) = 1,28$ ;  $P = 0,32$ ] ou a interação entre pré-tratamento e tratamento [ $F(3,46) = 0,93$ ;  $P = 0,46$ ]. Vale aqui comentar que o número de animais de alguns grupos desse experimento será aumentado para posterior publicação dos dados, assim, possivelmente aumentando o poder estatístico. No entanto, até o momento, esses resultados sugerem um mecanismo ação diferente mediando o efeito do CBD.



**Figura 15.** O efeito do CBD 1 hora após o condicionamento do medo é independente dos receptores CB1, CB2 ou 5-HT<sub>1A</sub>. O grupo que recebeu CBD 30 pmol apresentou menor tempo de congelamento que o controle durante o Teste A<sub>1</sub> e Teste B<sub>1</sub>. O pré-tratamento com AM251 (antagonista CB1 - 0,5 nmol/0,5 µL/lado), AM630 (antagonista CB2 - 0,1 nmol/0,5 µL/lado) ou WAY100635 (antagonista 5-HT<sub>1A</sub> - 0,14 nmol/0,5 µL/lado) não preveniu este efeito. Os valores são expressos como média ± EPM (n=4-11/grupo). A seta indica o tempo de injeção de drogas após o condicionamento do medo. Os \* indicam a significância (P < 0,05) do grupo controle (VEI - VEI) na sessão.

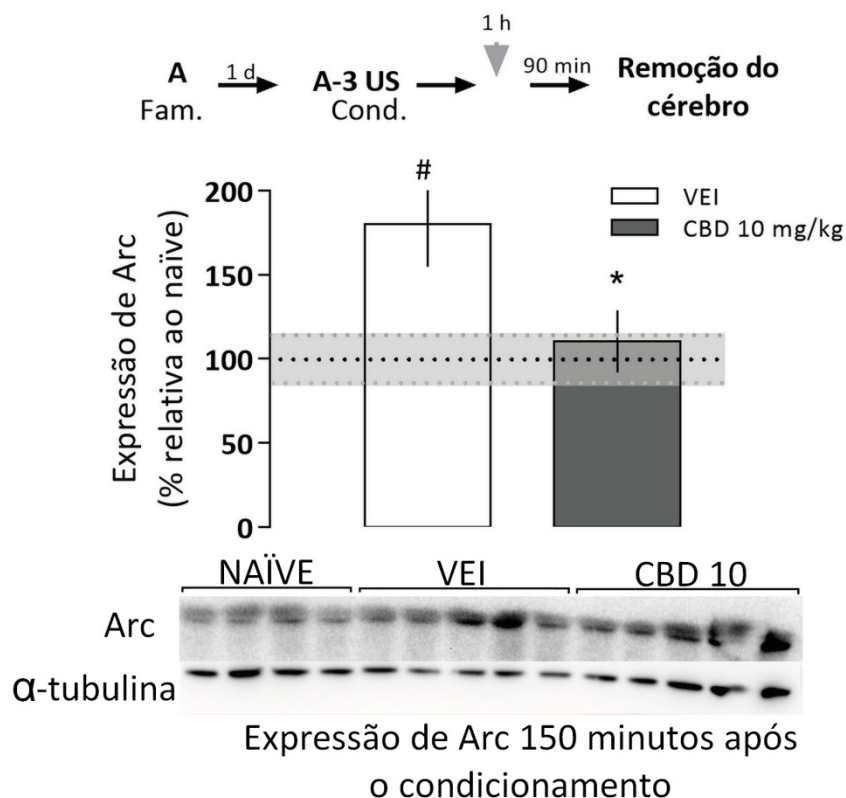
### 5.5. Experimento 5: A administração de CBD imediatamente ou 1 hora após o condicionamento reduz a expressão da proteína Arc no HD.

Arc, um produto de um gene de expressão imediata, é necessário para a consolidação da memória (KORB & FINKBEINER, 2011). Portanto, para avaliar se o CBD altera a expressão de Arc no HD, 40 ratos foram condicionados e receberam a administração sistêmica de veículo ou CBD (10 mg/kg) imediatamente ou 1 hora após o condicionamento e após 90 minutos, respectivamente, foram decapitados para avaliação da expressão da Arc. Um grupo adicional de animais naïve foi usado para avaliar a expressão basal da proteína. A ANOVA de uma via mostrou um efeito do tratamento para a expressão de Arc [ $F(2,19) = 17,34$ ;  $P = 0,00005$ ]. Como observado na Figura 16, houve um aumento na expressão da Arc do grupo que recebeu veículo imediatamente após o condicionamento quando comparado com a expressão basal. No entanto, o tratamento com CBD reduziu essa expressão.



**Figura 16.** A administração sistêmica de CBD imediatamente após o condicionamento reduziu a expressão de Arc no HD. Imediatamente após o condicionamento, os animais receberam a administração sistêmica de veículo ou CBD (10 mg/kg). Após 90 minutos os cérebros foram removidos e o HD foi coletado. Um grupo adicional de animais naïve foi usado para avaliar a expressão basal de Arc. 90 minutos após o condicionamento, há um aumento na expressão de Arc nos ratos que receberam veículo quando comparado ao basal. O tratamento com CBD reduziu essa expressão. A seta indica o tempo de injeção de drogas após o condicionamento. Os \* indicam a significância ( $P < 0,05$ ) do grupo controle ( $n=7-9$ /grupo). O # indica a significância ( $P < 0,05$ ) do grupo naïve (linha de base). A linha preta tracejada indica a média do grupo naïve (100%). A faixa cinza indica o EPM do grupo naïve.

Após 1 hora, a ANOVA de uma via mostrou um efeito do tratamento [ $F(2,23) = 4,35$ ;  $P = 0,025$ ]. Como mostrado na Figura 17, houve um aumento na expressão do Arc do grupo que recebeu veículo uma hora após o condicionamento, entretanto, o tratamento com CBD reduziu essa expressão, sugerindo que, independente do tempo, o CBD reduz a expressão de Arc no HD.



**Figura 17.** A administração sistêmica de CBD 1 hora após o condicionamento reduziu a expressão de Arc no HD. 1 hora após o condicionamento, os animais receberam a administração sistêmica de veículo ou CBD (10 mg/kg). Após 90 minutos do tratamento os cérebros foram removidos e o HD foi coletado. Um grupo adicional de animais naïve foi usado para avaliar a expressão basal de Arc. 150 minutos após o condicionamento, há um aumento na expressão de Arc nos ratos que receberam veículo quando comparado ao basal. O tratamento com CBD reduziu essa expressão. A seta indica o tempo de injeção de drogas após o condicionamento. O \* indica a significância ( $P < 0,05$ ) do grupo controle ( $n=8-9/\text{grupo}$ ). O # indica a significância ( $P < 0,05$ ) do grupo naïve (linha de base). A linha preta tracejada indica a média do grupo naïve (100%). A faixa cinza indica o EPM do grupo naïve.



## **6. Discussão**

No presente trabalho encontrou-se que o CBD prejudica a consolidação e a generalização da memória de medo quando administrado no HD imediatamente e 1 hora após a aquisição, mas não 30 minutos e 3 horas após. O efeito imediatamente após foi prevenido pelo antagonismo dos receptores CB1 e CB2, já o antagonismo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> não previne completamente o efeito. Ainda, a inibição seletiva da FAAH no HD prejudica a generalização da memória. 1 hora após a aquisição, nem o antagonismo dos receptores CB1 e CB2, nem dos 5-HT<sub>1A</sub> previne o efeito do CBD. Por fim, foi visto que o condicionamento leva ao aumento de Arc no HD 90 e 150 minutos após o condicionamento, e a administração sistêmica de CBD imediatamente ou 1 hora após, respectivamente, diminui a expressão de Arc.

### **6.1. Efeito do CBD no HD durante a janela temporal de consolidação da memória de medo**

A infusão da maior dose utilizada (30 pmol) de CBD no HD, imediatamente após um condicionamento de medo intenso, reduziu o comportamento de congelamento dos animais em comparação ao grupo que recebeu veículo quando foram re-expostos ao Contexto A pareado tanto um como sete dias depois – Teste A1 e Teste A2 respectivamente.

Este resultado se mostra de acordo com trabalhos anteriores do nosso grupo em que o CBD quando administrado sistemicamente, imediatamente após um condicionamento de medo moderado, 3 choques de 0,6 mA, prejudicou a consolidação da memória (STERN et al., 2017). No entanto, quando o CBD é administrado sistemicamente, imediatamente após um protocolo de condicionamento de similar intensidade ao utilizado nesse trabalho, 3 choques de 0,8 mA, um efeito teto é observado no Contexto A, conseqüentemente, o CBD não altera o tempo de congelamento no Teste A1 e Teste A2 (STERN et al., 2017), o que não observado quando o CBD é administrado diretamente no HD. Portanto, é possível sugerir que, após a administração sistêmica, pode haver uma compensação entre a ativação das

áreas cerebrais, ou então devido à questões farmacocinéticas, o efeito do CBD no Contexto A é poupado em um protocolo intenso de condicionamento, sendo assim, sua administração no HD suficiente para levar ao efeito observado neste trabalho.

Sabe-se que o CBD tem um efeito anti-aversivo (GUIMARÃES et al., 1990), no entanto, em relação a respostas incondicionadas, outras regiões cerebrais estão mais envolvidas nesse efeito como PAG e núcleo leito da estria terminal (CAMPOS & GUIMARÃES, 2008; GOMES et al., 2012). O CBD também tem o mesmo efeito em relação a respostas condicionadas (LEMOS et al., 2010) e embora, de fato, essas respostas compartilham regiões com aquelas relacionadas a formação e manutenção das memórias como o córtex pré-límbico (FOGAÇA et al., 2014), o momento da administração da droga é próximo da re-exposição ao contexto e não após a aquisição, como no caso do presente trabalho.

Também, já foi mostrado que após a administração i.p. de uma alta dose de CBD (120 mg/kg), sua meia vida tanto no cérebro como no plasma foi de aproximadamente 4 h sendo que após 24 h os níveis de CBD já estavam abaixo do nível de detecção (DEIANA et al., 2012). Assim, é possível que no caso do presente trabalho também não haja uma atividade residual da droga horas depois de sua administração ou no momento da re-exposição ao Contexto A.

Embora uma avaliação 24 h após a administração de CBD no HD em um teste específico para comportamento tipo-ansiedade como o labirinto em cruz elevado não tenha sido feita, já foi visto que a administração i.p. de  $\Delta^9$ -THC (0,3 mg/kg) ou  $\Delta^9$ -THC (0,1 mg/kg) associado com o CBD (1 mg/kg), doses capazes de prejudicar a reconsolidação da memória de medo, 24 h antes dos animais serem testados no labirinto em cruz elevado, não levou a diferenças significativas no comportamento dos animais em relação aos que receberam veículo (STERN et al., 2015). Ainda, como a porção dorsal do hipocampo está mais relacionada com a consolidação das memórias (FANSELOW & DONG, 2010) e a exposição ao Contexto A sete dias após, mostra que o efeito foi duradouro, já que a porcentagem de congelamento dos animais que receberam

CBD permanece mais baixa em relação ao grupo que recebe veículo, é provável que isso não seja referente ao efeito anti-aversivo do CBD.

Assim, esses resultados sugerem que mesmo após um condicionamento de intensidade elevada, o CBD é capaz de prejudicar a consolidação da memória de medo contextual, sendo a atividade do HD necessária para esse fenômeno. De fato, o papel do HD na consolidação da memória de medo tem sido demonstrado tanto em protocolos de condicionamento moderados quanto intensos. Por exemplo, já foi visto que a administração de um antagonista dos receptores GABA<sub>B</sub> ou um agonista dos receptores  $\kappa$  opioides no HD após um protocolo de condicionamento intenso (5 choques de 0,8 mA e 3 choques de 1,0 mA, respectivamente) foi capaz de potencializar a generalização da memória do medo (LYNCH et al., 2017; VANZ et al., 2018). Já a administração de propanolol imediatamente após um condicionamento intenso (2 choques de 1,4 mA) prejudicou a consolidação da memória (ZHU et al., 2018). Ainda, em protocolos de 3 ou 2 choques de 0,5 mA, que caracterizam condicionamentos menos intensos, a infusão imediatamente após o condicionamento no HD do antagonista dos receptores 5-HT<sub>6</sub>, (SCHMIDT et al., 2016), ou do inibidor da kinase LIM (LUNARDI et al. al., 2017) prejudicou a consolidação da memória de medo. Assim, independente da intensidade do treino, imediatamente após a aquisição, o HD está envolvido nos mecanismos de consolidação da memória.

Quando exposto ao Contexto B não pareado, 2 ou 8 dias após o condicionamento, o grupo que recebeu veículo apresentou uma alta porcentagem de congelamento, sugerindo a ocorrência de generalização do medo. Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores de nosso (GAZARINI et al., 2014; STERN et al., 2017) e outros grupos (BALDI et al., 2004; KROON & CAROBREZ, 2009; FINSTERWALD et al., 2015) em que, com o aumento da intensidade do treino, os animais perdem a capacidade de restringir a expressão do medo ao contexto condicionado.

No entanto, os animais tratados com a maior dose de CBD (30 pmol), imediatamente após o condicionamento de medo, apresentaram menos comportamento de congelamento do que os controles no Teste B1 ou no Teste B2, confirmando relatos anteriores que mostram a capacidade da

administração sistêmica do CBD em prevenir a generalização, quando administrado imediatamente após um condicionamento de medo intenso (STERN et al., 2017). Ainda, já foi visto que o CBD também foi capaz de prevenir a generalização do medo ao se prejudicar a reconsolidação da memória, no protocolo em que se utiliza o aumento a transmissão noradrenérgica, no entanto, foi necessário associá-lo com um agente que leva a labilização da memória, a D-cicloserina, agonista parcial dos receptores NMDA (GAZARINI et al., 2014). Assim, os resultados do presente trabalho mostram que o CBD quando infundido no HD imediatamente após a aquisição é capaz de prejudicar a consolidação e a generalização da memória de medo e confirmam que essa região cerebral é importante não apenas para a consolidação, mas também para manutenção da especificidade de memórias contextuais (WINOCUR et al., 2007; WILTGEN et al., 2010; DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2012).

Assim, sabendo-se que o período de consolidação da memória é classicamente descrito como tendo a duração de 6 horas (FLEXNER et al., 1967; DUDAI, 2004), buscou-se avaliar o efeito da infusão de CBD em tempos após a aquisição dentro dessa janela. Quando o CBD (30 pmol) foi infundido no HD 30 minutos após o condicionamento nenhuma diferença significativa no comportamento de congelamento foi observada quando comparado ao grupo que recebeu veículo, seja durante a exposição ao Contexto A pareado ou ao Contexto B não pareado. Isso sugere que ao menos neste momento, o CBD não é capaz de interferir na consolidação e generalização da memória do medo.

Entretanto, a infusão de CBD (30 pmol) no HD, 1 hora após o condicionamento, reduziu o comportamento de congelamento quando comparado aos animais que receberam veículo na re-exposição ao Contexto A 24 horas e 7 dias depois. Um efeito dependente do tempo do CBD na consolidação da memória já foi observado em outros trabalhos. Por exemplo, quando o CBD foi infundido no córtex pré-límbico de ratos, imediatamente após o condicionamento de medo, não produziu efeitos prejudiciais à memória, no entanto, após 5 horas do condicionamento, a infusão de CBD no córtex pré-límbico prejudicou especificamente a persistência da memória (ROSSIGNOLI

et al. 2017). Essas diferenças podem refletir os diferentes mecanismos envolvidos nessas áreas durante a consolidação da memória. Durante o Teste B1 e Teste B2, os animais tratados com CBD 1 hora após o condicionamento do medo também apresentaram menos comportamento de congelamento que os controles, confirmando que, ao prejudicar a consolidação da memória, é possível evitar a formação de generalização (GAZARINI et al., 2014).

No entanto, quando o CBD (30 pmol) foi infundido no HD 3 horas após o condicionamento, nenhuma diferença nos níveis de congelamento dos animais foi observada quando submetidos ao Teste A1 e Teste A2 ou Teste B1 e Teste B2. Algo semelhante já foi visto quanto a administração de midazolam, que foi capaz de prejudicar a consolidação de uma memória de medo quando administrado no HD imediatamente após o condicionamento, no entanto quando administrado 3h após não leva a nenhum efeito (GAFFORD, 2005).

Ainda, um trabalho recente sugere que, dependendo da intensidade do treino, o tempo de evolução da consolidação pode mudar. A administração de lidocaína no HD, que inativa temporariamente a região, 3 horas após um condicionamento de medo mais intenso (2 choques de 0,7 mA) não é capaz de interferir na consolidação da memória, enquanto ao se tratar de uma memória de medo referente a um protocolo menos intenso (2 choques de 0,4 mA), sua consolidação, de fato, pode sofrer interferências até 6 horas após a aquisição (CASAGRANDE et al., 2018). Assim, considerando a intensidade do condicionamento utilizada no presente trabalho, embora as condições não sejam exatamente as mesmas do trabalho citado, é possível que a janela de consolidação dessa memória seja menor, e por isso uma administração de CBD às 3 horas após a aquisição não seja realmente capaz de fazer efeito. Além disso, também é possível que, nestes tempos posteriores da consolidação da memória, diferentes mecanismos ou áreas cerebrais sejam recrutados, poupando o efeito do CBD.

## **6.2. O mecanismo de ação do CBD na janela de consolidação da memória de medo**

Visando elucidar quais mecanismos de ação poderiam mediar os efeitos do CBD observados tanto imediatamente após a aquisição, quanto 1 hora após, a investigação no presente trabalho levou em conta seu amplo espectro de ação (IZZIO et al., 2009), também o fato da participação dos receptores canabinóides e do receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> ser as que mais frequentemente estão envolvidas nos efeitos do CBD quanto às respostas emocionais e referentes a memória (para revisão ver LEE et al., 2017).

Na presente investigação o pré-tratamento com os antagonistas dos receptores CB1 e CB2, AM251 e AM630 respectivamente, imediatamente após o condicionamento de medo, foi capaz de prevenir o efeito do CBD na consolidação e generalização da memória, sendo esse efeito caracterizado por uma porcentagem de tempo de congelamento significativamente maior do que os animais que receberam o CBD, mas tiveram veículo como pré-tratamento, e também semelhante à porcentagem de congelamento dos animais que receberam apenas veículo – tanto no teste A, como no teste B. Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores em que o bloqueio sistêmico ou no HD dos receptores CB1 ou CB2 impediu o efeito sistêmico do CBD na generalização da memória (STERN et al., 2017).

Além disso, estes resultados são consistentes com trabalhos mostrando a importância dos receptores CB1 e/ou CB2 do HD na consolidação da memória de medo, em que no geral a administração de agonistas como a própria anandamida, o WIN55,212-2 (um potente agonista CB1/CB2), o HU-210 (agonista seletivo CB1) e o GP1a (agonista seletivo CB2) prejudicam a consolidação da memória de medo, tanto no modelo de condicionamento de medo ao contexto (MACKOWIAK et al., 2009), como no da esQUIVA INIBITÓRIA (PIRI & ZARRINDAST, 2011; SHOSHAN & AKIRAV, 2017; NASEHI et al., 2017; 2018). Ainda, tanto a administração do antagonista AM630 leva a prejuÍZOS na consolidação (NASEHI et al., 2017; 2018) como animais *knockout* para o receptor CB2 aprendem menos a memória aversiva em relação aos animais selvagens (GARCÍA-GUTIERREZ et al., 2013), ambos no modelo da

esquiva inibitória. Outro trabalho mostrou que o aumento da expressão de receptores CB2 microgliais no HD pela técnica de vírus adeno-associado potencializa a memória aversiva, enquanto a diminuição da expressão dos mesmos prejudica a memória no modelo de medo condicionado ao som (LI & KIM, 2016). De fato, a diminuição da atividade do receptor CB2 parece estar associada à diminuição das respostas defensivas. Embora tenha sido de interesse utilizar uma dose de AM630 que não tivesse um efeito *per se*, de maneira não significativa, os animais que receberam o pré-tratamento com essa droga e posteriormente veículo apresentaram uma porcentagem de congelamento menor do que os que receberam apenas veículo no teste B. Ainda assim, o pré-tratamento com AM630 seguido da infusão de CBD é capaz de elevar a porcentagem de congelamento dos animais, mostrando que o antagonismo previne os efeitos do CBD.

Vale a pena citar que os receptores CB1 e CB2 participam também da consolidação de memórias não-aversivas. A administração do agonista seletivo CB1, ACEA, prejudica a memória de reconhecimento de objetos (CLARKE et al., 2008), enquanto a diminuição da expressão dos receptores CB2 em células piramidais melhora esse mesmo tipo de memória (LI & KIM, 2016). Ainda trabalhos anteriores mostram que os efeitos de atenuação da memória de medo induzidos pelo CBD, seja na facilitação da extinção ou prejudicando a reconsolidação da memória aversiva, dependem também dos receptores CB1 (BITENCOURT et al., 2008; DO MONTE et al., 2013; STERN et al., 2012).

Os animais que receberam o pré-tratamento com WAY100635 apresentaram uma reversão parcial do efeito do CBD, ou seja, a porcentagem de tempo de congelamento não foi significativamente diferente nem dos animais que receberam apenas veículo, nem dos animais que receberam veículo como pré-tratamento e CBD. Esta falta de efeito pode ser devido à dose adotada do antagonista ou porque os receptores 5-HT<sub>1A</sub> no HD não são tão recrutados para esta tarefa. Nos trabalhos em que o WAY100635 preveniu os efeitos do CBD nas respostas defensivas, utilizou-se uma dose um pouco maior do antagonista (0,37 nmol; CAMPOS & GUIMARÃES, 2008; CAMPOS et al., 2013; FOGAÇA et al., 2014). No entanto, a dose utilizada nesses trabalhos é baseada em outro em que 3 doses de WAY100635 foram infundidas na PAG,



inclusive uma dose semelhante a utilizada no presente estudo e nenhuma delas levou a efeitos *per se* nos comportamentos defensivos avaliados (DE PAULA & ZANGROSSI, 2004).

Ainda, já foi visto que animais com hipotransmissão serotoninérgica apresentaram déficits na aquisição da memória de tarefa de reconhecimento de objetos, entretanto, tanto quando o 8-OH-DPAT, um agonista 5-HT<sub>1A</sub>, ou WAY100635 foram administrados após o treino do condicionamento de medo no HD, nenhuma diferença na consolidação da memória foi observada (STIEDL et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2017), sugerindo que, pelo menos no HD, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> não tem uma grande participação na consolidação da memória de medo. Além disso, como já citado, os efeitos do CBD mediados pelo 5-HT<sub>1A</sub> são relacionados a um efeito anti-aversivo. Esse efeito é observado em modelos utilizados para avaliação de comportamentos de ansiedade, ou seja, o receptor 5-HT<sub>1A</sub> parece estar mais relacionado com o efeito tipo-ansiolítico do CBD (CAMPOS & GUIMARÃES, 2008; GOMES et al., 2012; CAMPOS et al., 2012; FOGAÇA et al. 2014). Adicionalmente, também foi visto que o 5-HT<sub>1A</sub> medeia o efeito do CBD durante a aquisição de uma memória do medo olfatória, quando administrado no núcleo *accumbens shell* (NORRIS et al., 2016), assim, parece que de fato há um envolvimento diferente desse receptor na aquisição e consolidação da memória, além dos mecanismos que diferentemente são recrutados nas distintas tarefas e regiões cerebrais. Vale ressaltar também que a administração sistêmica do WAY100635 não foi capaz de prevenir os efeitos do CBD de prejudicar a reconsolidação da memória de medo (STERN et al., 2012). Ainda, o efeito tipo-ansiolítico da administração crônica de CBD em ratos que foram cronicamente submetidos ao estresse também não dependeu do 5-HT<sub>1A</sub>, mas sim dos receptores CB1 e CB2 (FOGAÇA et al., 2018), sugerindo que a intensidade do estresse pode recrutar mecanismos diferentes e que em situações de maior estresse a participação do 5-HT<sub>1A</sub> no efeito do CBD é menor.

Em conjunto, esses resultados sugerem que, imediatamente após o condicionamento de medo, o efeito do CBD na consolidação da memória depende principalmente dos receptores CB1 e CB2. Como o CBD tem uma baixa afinidade pelos receptores CB1 e CB2, não atuando como agonista dos



mesmos (PERTWEE, 1997), sugere-se um efeito indireto devido a inibição da FAAH (BISOGNO et al., 2001; DE PETROCELLIS et al., 2011), e assim nossos resultados sugerem uma participação da anandamida no efeito mediado pelo CBD no HD.

A fim de se investigar se a inibição seletiva da FAAH levaria a efeitos semelhantes ao do CBD quando administrado imediatamente após o condicionamento no HD, o URB597 foi utilizado. Assim, os animais que receberam a infusão de URB597 no HD imediatamente após o condicionamento intenso apresentaram uma diminuição do comportamento de congelamento quando expostos ao Contexto B não pareado em comparação ao que receberam veículo. Diferentemente do observado com a administração do CBD, a administração do URB597 não foi capaz de diminuir o comportamento de congelamento na re-exposição ao Contexto A. Por se tratar de um inibidor seletivo, foi de escolha utilizar uma dose baixa do URB597, no entanto pode ser que a dose escolhida não tenha sido suficiente para prejudicar a expressão do medo no Teste A, mas ainda assim foi capaz de prevenir a generalização. Ainda, devido a sua característica seletiva, pode ser que de fato, a inibição unicamente da FAAH não seja o suficiente para prejudicar a expressão do medo no Teste A, podendo haver algum mecanismo compensatório devido ao condicionamento intenso.

Ainda assim, esses resultados concordam com trabalhos que mostram que a administração sistêmica do URB597 (BUSQUETS-GARCIA, 2011; STERN et al., 2017) e da própria anandamida (CASTELLANO et al., 1997) é capaz de prejudicar a consolidação ou generalização da memória de medo. Entretanto, de forma diferenciada, quando o URB597 foi administrado durante a consolidação de uma memória de esquiva inibitória em ratos, foi capaz de potencializar a memória de medo (MORENA et al., 2014; RATANO et al., 2017). Parece haver nesses casos a participação de outros receptores como TRPV1 e PPAR alfa, além dos receptores CB1 e CB2 no efeito proporcionado pelo URB597 (RATANO et al., 2017). Assim, diferenças no nível de excitação emocional pelo estresse das condições experimentais e tarefas comportamentais podem explicar os dados conflitantes, já que não é primeira vez que se observa diferenças quanto ao modelo da esquiva inibitória, em que

administrações pós-treino do AM251 parecem prejudicar, e da anandamida potencializar, a consolidação da memória de medo (DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2008). Ainda, de fato, uma avaliação com outras doses de URB597, e nos outros períodos de tempo após a aquisição, no modelo do condicionamento de medo é uma opção para melhor elucidar os efeitos da inibição da FAAH no HD na consolidação da memória de medo nesse modelo.

Além disso, a inibição da FAAH ou da recaptção anandamida já foi claramente demonstrada que é capaz de facilitar a extinção da memória de medo (CHHATWAL et al., 2005; PAMPLONA et al., 2008; BITENCOURT et al., 2008; MANWELL et al. 2009; ABUSH & AKIRAV, 2008; 2010; LIN et al., 2011; LARICCHIUTA et al., 2013; LISBOA et al., 2015). Ainda, já foi observado também que elevação da anandamida foi capaz de prejudicar a LTP, e assim, mecanismos de plasticidade, através da sinalização do receptor CB1 (BASAVARAJAPPA et al., 2014).

No entanto, foi observado que o pico de liberação de anandamida no HD após um treino de alta intensidade de choque é de 10 minutos, sendo que aos 30 minutos e 1 hora depois, os níveis retornam equivalentes aos basais (MORENA et al., 2014). Sabe-se que a síntese e liberação anandamida ocorrem sob demanda, após um estímulo estressante (MUNRO et al., 1993) e seus efeitos são de curta duração, uma vez que são rapidamente hidrolisados ou recaptados nos terminais sinápticos (GIUFFRIDA et al., 2001; MCKINNEY & CRAVATT, 2005). Consequentemente, essa característica poderia explicar a falta de efeito do CBD quando infundido no HD 30 minutos após o condicionamento de medo.

Algo semelhante foi observado num estudo que os animais que passaram por um estresse prévio (choque inescapável de alta intensidade – 1,0 mA) ou receberam a dexametasona (potencializando a transmissão glicocorticoide, relacionada ao estresse) a um treino de baixa intensidade (2 choques de 0,3 mA) no modelo de condicionamento ao contexto. Quando o estresse foi imediatamente antes ao condicionamento, a infusão de AM251 no HD imediatamente após foi capaz de diminuir o comportamento de congelamento dos animais na re-exposição. No entanto, quando os animais passaram pelo

estresse ou receberam dexametasona 30 min antes do condicionamento, nenhum efeito foi observado sob a infusão de AM251 no HD imediatamente após o treino de intensidade leve. Assim, concordando que os endocanabinoides liberados frente ao estresse tem uma ação curta e sob demanda (DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2010).

Nessa linha, é possível supor que o efeito do CBD na consolidação da memória, uma hora após o condicionamento do medo, é mediado por um mecanismo de ação diferente do observado imediatamente após o condicionamento. De fato, nem o bloqueio dos receptores CB1/CB2 nem o antagonismo 5-HT<sub>1A</sub> foram capazes de prevenir os efeitos de prejuízo na consolidação da memória induzida pelo CBD uma hora depois, ou seja, nenhum dos grupos que recebeu o pré-tratamento com um dos antagonistas e posteriormente CBD mostrou uma porcentagem de tempo de congelamento significativamente diferente do grupo que recebeu veículo como pré-tratamento e CBD. Ainda, embora de maneira não significativa, o grupo de recebe o pré-tratamento com WAY100635 e posteriormente veículo apresentou uma porcentagem de congelamento menor do que os animais que receberam apenas veículo, assim, por mais que a dose utilizada seja menor do que a utilizada em outros trabalhos (CAMPOS & GUIMARÃES, 2008; CAMPOS et al., 2013; FOGAÇA et al., 2014), 1 hora após o condicionamento é possível que o bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> tenha algum efeito na consolidação da memória. No entanto, os animais que receberam WAY100635 e posteriormente CBD apresentaram uma porcentagem de tempo de congelamento muito semelhante aos animais que receberam veículo e posteriormente CBD. Assim, esses resultados sugerem que, pelo menos nas doses testadas, 1 hora após o condicionamento o efeito do CBD no HD não depende dos receptores CB1, CB2 ou 5-HT<sub>1A</sub>, sugerindo que outros alvos do CBD como os receptores PPAR gama ou os receptores TRPV1, podem mediar esse efeito (IZZO et al., 2009).

As funções do TRPV1 no sistema nervoso central ainda vêm sendo desvendadas. Camundongos *knockout* para o TRPV1 exibem uma diminuição nos comportamentos relacionados à ansiedade, aprendem menos no condicionamento de medo ao som e também a LTP é reduzida em células do HD desses animais (MARSCH et al., 2007). Ainda, alguns trabalhos apontam

que a ativação desse receptor leva a aumentos da excitabilidade neuronal, aumentando o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (KIM et al., 2005; 2006). Assim, tem sido mostrada sua participação na plasticidade neuronal (EDWARDS, 2014), podendo inclusive induzir o processo de depressão de longa duração (LTD) em interneurônios hipocâmpais (GIBSON et al., 2008). Ainda, esses efeitos na plasticidade podem ser dependentes do aumento da anandamida (YANG et al., 2014), como também já observados na indução da LTD em neurônios da amígdala, diminuindo a excitabilidade dessas células (PUENTE et al., 2011). Esses mecanismos podem, então, estar relacionados com o prejuízo na consolidação da memória. Entretanto, enquanto a contribuição dos receptores TRPV1 na aquisição de memórias de medo já foi observada (SHIRI et al., 2016), seu papel na consolidação não é claro. Geralmente os efeitos mediados pela anandamida nos receptores TRPV1 estão relacionados a altas concentrações desse endocanabinoide, assim a ativação desses receptores pela anandamida geralmente limita suas ações via CB1 (ZYGMENT et al., 1999; SMART et al., 2000; MORGESE et al., 2007) e isso é associado à curva dose-efeito em U dos canabinoides. Discute-se então, se os receptores CB1 e os TRPV1 são dois lados da mesma moeda, já que tem o mesmo ligante e aparentemente ações opostas (MOREIRA et al., 2012). Um trabalho mostra que a administração do N-aracdonoil-serotonina, uma droga que tem uma ação dual de inibir a FAAH e antagonizar o TRPV1, tanto sistêmica como no HD, em doses baixas, foi capaz de prejudicar a expressão da memória de medo. Ainda, a administração de uma dose sem efeito *per se* do antagonista TRPV1 faz com que uma dose de URB597 que não apresentou efeito *per se*, passe a prejudicar a expressão da memória de medo, mostrando que a inibição do TRPV1 pode potencializar o efeito da anandamida via CB1 (GOBIRA et al., 2017).

No entanto, como já comentado, o efeito mediado pelo CBD à 1 h após o condicionamento parece não depender de anandamida. Assim, se esse efeito depende da ativação do TRPV1, o próprio CBD pode atuar como um agonista do mesmo (BISOGNO et al., 2001). Embora esse mecanismo esteja associado também a altas concentrações, e a mesma dose que mostrou ter um efeito via CB1/CB2 foi utilizada, pode ser que pela falta da própria liberação de

anandamida, o mecanismo de ação tenha sido “desviado” para o de ativação dos receptores TRPV1, assim possivelmente induzindo mecanismos de LTD, podendo esse ser um mecanismo distinto daquele observado em outras etapas da memória.

Ainda, vale a pena comentar que os receptores PPAR gama também podem ser um alvo nesse caso. Tem sido visto que esses receptores têm propriedades neuroprotetoras, afetando a função sináptica e assim, é um alvo terapêutico para a doença de Alzheimer (MANDREKAR-COLUCCI & LANDRETH, 2011). Além disso, trabalhos em roedores mostraram que esses receptores são importantes para a consolidação da memória (DENNER et al., 2012; JAHRLING et al., 2014). De fato, alguns trabalhos que mostram o efeito do CBD em reduzir a neuroinflamação e promover neurogênese em modelos animais de Alzheimer têm como mecanismo de ação os receptores PPAR gama (ESPOSITO et al., 2011, FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2013; CAMPOS et al., 2016). Assim, tanto os receptores TRPV1 quanto os PPAR gama ainda precisam ser investigados quanto a seus possíveis papéis na mediação do efeito do CBD na consolidação de memórias aversivas.

### **6.3. O efeito do CBD sobre a expressão da proteína Arc no HD**

A expressão de genes de expressão imediata, como o Arc, tem sido estudada como marcadores de mecanismos de plasticidade e ativação de áreas cerebrais que suportam a consolidação da memória de longo prazo (HEROUX et al., 2018). No presente trabalho, os animais que receberam veículo imediatamente ou 1 hora após o condicionamento de medo, apresentaram maior expressão de Arc no HD, 90 ou 150 minutos após o condicionamento, respectivamente, em relação à expressão dos animais naïve. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos que mostram que há o aumento da expressão de Arc no HD após o condicionamento de medo (LONEGAN et al., 2010; CZERNAWSKI et al. al., 2011; BESNARD et al., 2014), que a inibição dessa proteína no HD prejudica a LTP e a consolidação das memórias (GUZOWSKI et al., 2000; LI et al., 2005; CZERNAWSKI et al. al., 2011), e ainda que animais *knockout* para Arc apresentam prejuízos na

consolidação das memórias (PLATH et al., 2006). Também, há evidências de que mesmo após 240 minutos de um condicionamento aversivo, sua expressão ainda é alta no HD (MESSAOUDI et al., 2007). Em conjunto esses resultados reforçam a importância da expressão dessa proteína no HD na consolidação das memórias de medo.

Ainda, vale comentar que em neurônios hipocampais, a expressão de Arc aumenta a densidade de espinhas dendríticas do tipo finas, que são importantes para os mecanismos de plasticidade que medeiam a formação memória (PEEBLES et al., 2010). Adicionalmente, a expressão dessa proteína no HD também é requerida para memórias espaciais que são dependentes dessa estrutura (GUZOWSKI et al., 2001; GRANADO et al., 2008), e em modelos animais da doença de Alzheimer, a expressão da Arc encontra-se diminuída (MORIN et al., 2016a; 2016b). Ainda, um trabalho recente mostrou que a privação de algumas horas de sono levou a diminuição da Arc no HD o que justifica a diminuição do desempenho em tarefas dependentes do hipocampo (DELORME et al., 2018). No geral, esses dados mostram a importância dessa proteína em mecanismos de plasticidade e memória, mesmo que não aversiva.

O tratamento sistêmico com CBD imediatamente ou 1 hora após o condicionamento de medo reduziu a expressão da Arc 90 ou 150 minutos após, respectivamente, sugerindo que o prejuízo na consolidação da memória mediada pelo CBD depende da inibição da expressão da Arc no HD. Estudos em cultura de células hipocampais mostraram que o CBD reduziu a atividade espontânea e inibiu a transmissão sináptica, efeitos que dependeram dos receptores CB1 e 5-HT<sub>1A</sub>, respectivamente (LEDGERWOOD et al., 2011). Como a expressão da Arc sugere um aumento de atividade neuronal, a redução dessa proteína, induzida pelo tratamento com CBD, pode ser mediada pela redução da liberação de neurotransmissores como o glutamato e consequente redução da atividade daquela região.

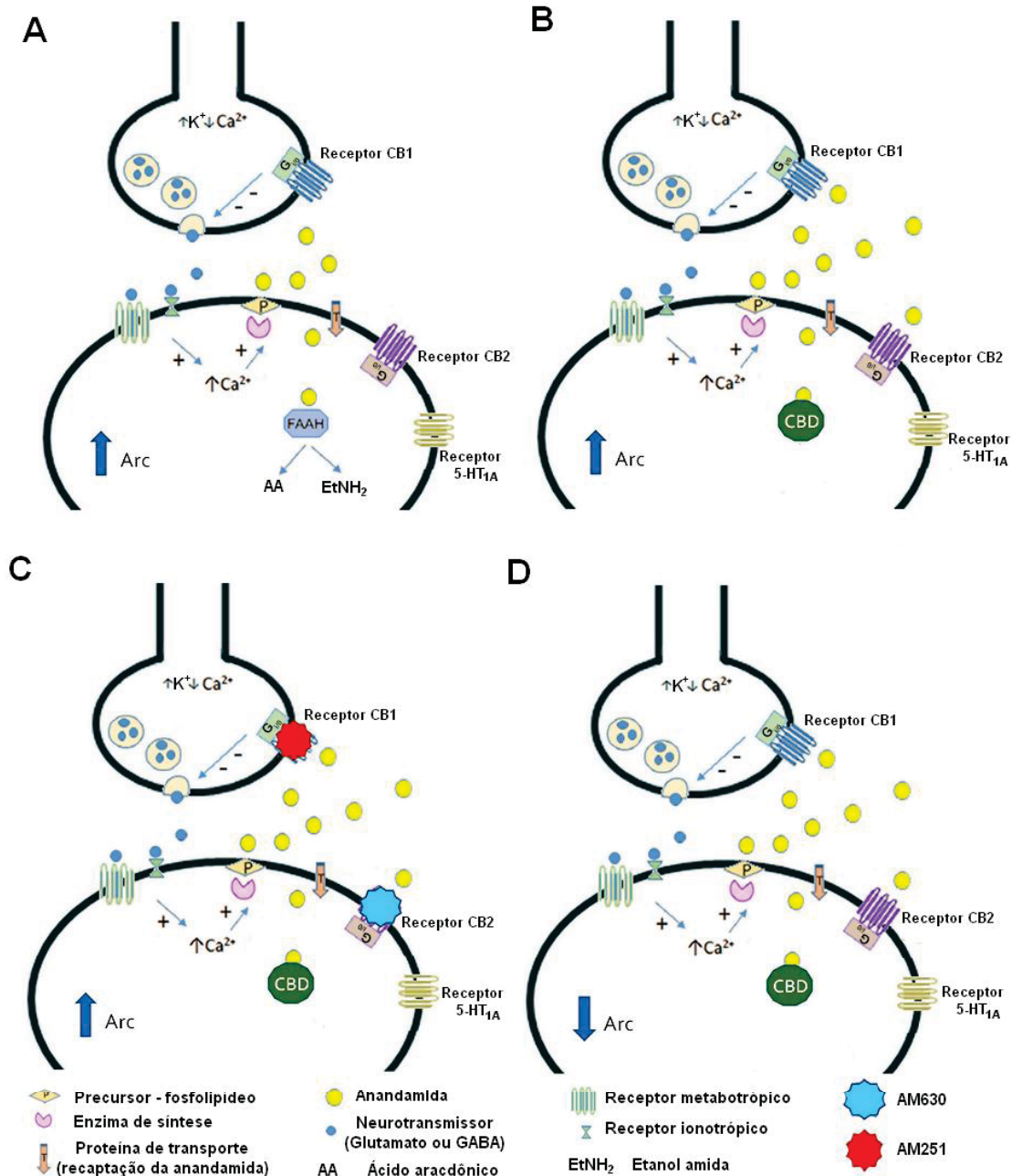
Já foi visto também que o tratamento crônico com o CBD em animais que passaram por estresse levando a respostas comportamentais tipo-ansiolíticas, também foi capaz de modular parâmetros de plasticidade neuronal como o

remodelamento dendrítico e o número de espinhas dendríticas (FOGAÇA et al. 2018). De maneira semelhante, em animais não estressados, o tratamento crônico com CBD foi capaz de diminuir a expressão de BDNF, outra proteína envolvida na plasticidade neuronal, e do seu receptor TrkB no hipocampo (ELBATSH et al., 2012). Assim, tanto administrações agudas do CBD, como a do presente trabalho, como prolongadas são capazes de interferir em mecanismos de plasticidade. Embora os mecanismos que levam a diminuição da expressão da Arc pelo CBD ainda precisam ser mais esclarecidos, é possível sugerir que, ao interferir na expressão do Arc, o CBD interfere na plasticidade sináptica e, conseqüentemente, na consolidação da memória.

Os esquemas a seguir – figuras 18 e 19 – resumem os principais resultados do trabalho.

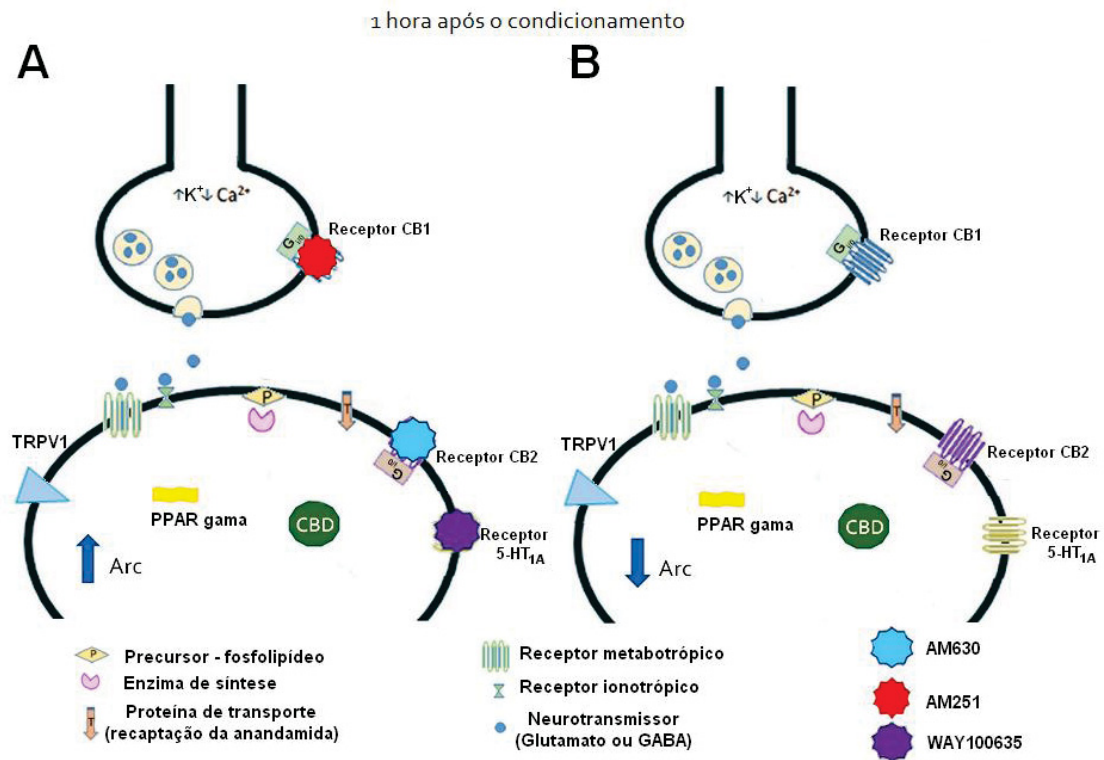


Imediatamente após o condicionamento



**Figura 18.** Esquema representativo do efeito e mecanismo de ação do CBD imediatamente após o condicionamento. **A.** Imediatamente após o condicionamento há a liberação da anandamida sobre demanda. Também há o aumento da expressão de Arc (vista 90 minutos após) **B.** A administração de CBD inibindo a FAAH aumenta a disponibilidade de anandamida na fenda sináptica. **C.** Esse mecanismo é sustentado pelo fato dos antagonistas dos receptores CB1 e CB2 prevenirem o efeito do CBD. **D.** A administração de CBD imediatamente após o condicionamento leva a diminuição da expressão de Arc no HD.





**Figura 19.** Esquema representativo do efeito e mecanismo de ação do CBD 1 hora após o condicionamento. **A.** Imediatamente após o condicionamento o antagonismo dos receptores CB1 e CB2 e do 5-HT<sub>1A</sub> não previne o efeito do CBD. Isso sugere que não há liberação de anandamida nesse momento da janela de consolidação, sugerindo outros alvos como o TRPV1 e PPAR gama. Também é possível observar o aumento da expressão de Arc (vista 150 minutos após) **B.** A administração de CBD independente do mecanismo, também é capaz de diminuir a expressão da proteína Arc no HD.

## 7. Considerações Finais

Nos últimos anos, o CBD vem sendo amplamente estudado e tem se mostrado uma droga com um mecanismo complexo. Embora se saiba que sua afinidade pelos receptores canabinoides seja baixa e a maioria dos efeitos mediados nesse sistema, na memória, seja de forma indireta pelo aumento da disponibilidade da anandamida, como já discutido anteriormente, outras possibilidades vem surgindo como o CBD ser agonista inverso dos receptores CB1/CB2 (THOMAS et al., 2007) ou, ainda um modulador alostérico negativo do receptor CB2 (MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2017), o que pode em parte contribuir para os efeitos relacionados a esse receptor na memória. Ainda vale comentar que uma integridade do sistema parece ser necessária para o efeito do CBD imediatamente após a aquisição, já que ao se antagonizar tanto o CB1, como o CB2 individualmente, o efeito do CBD é bloqueado.

Interessantemente, o presente estudo abriu a possibilidade de um mecanismo de ação do CBD, diferente daqueles classicamente elucidados na atenuação de respostas defensivas condicionadas e incondicionadas, participar do seu efeito prejudicial na consolidação das memórias aversivas em um período de tempo dentro da janela temporal que também não se conhecia ter efeito. Em conjunto, embora a capacidade de o CBD mediar mecanismos de neuroplasticidade venha sendo recentemente elucidada (LEDGERWOOD et al., 2011; FOGAÇA et al., 2018), essa é a primeira vez em que foi visto que o CBD pode modular a expressão da proteína Arc na etapa da consolidação da memória.

Pensando não apenas no uso do CBD isolado, mas da *Cannabis sp.* em geral, é curioso o fato de que parece ser uma característica dos fitocanabinoides (com exceções como o próprio  $\Delta^9$ -THC e do canabinol) possuírem um mecanismo de ação não seletivo, visto que o canabigerol, o ácido canabidiólico e o canabicromeno, compostos presentes em menor quantidade na planta, também apresentam a capacidade de ser agonistas TRPV1 e/ou TRPA1 e inibidores da recaptação da anandamida (PISANTI et al., 2017). Isso torna o entendimento de como os fitocanabinoides atuam em

conjunto levando aos efeitos biológicos algo ainda mais complexo, mas também interessante de ser explorado farmacologicamente.

Além disso, o presente trabalho trouxe mais evidências de que o HD – equivalente a porção posterior do hipocampo em humanos – em que alterações funcionais estão relacionadas com o TEPT e com a generalização da memória (CHEN & ETKIN, 2013; XU & SÜDHOF, 2013; LEVY-GIGI et al., 2015) está envolvido no efeito do CBD na consolidação de uma memória de medo generalizada tanto quando é micro-infundido na região, como quando se observa a diminuição da proteína Arc após administração sistêmica.

De fato, um estudo com pacientes com transtorno de ansiedade social generalizada, mostrou que o CBD, além de melhorar os sintomas da ansiedade, levou a alterações funcionais, elucidadas pelo nível de oxigenação, no hipocampo e giro parahipocampal dos indivíduos (CRIPPA et al., 2011), algo que já foi observado também em indivíduos saudáveis após o uso do CBD (CRIPPA et al., 2004; BHATTACHARYYA et al., 2015). Embora não se sabe se em pacientes com TEPT algo semelhante seria observado, sabe-se que o CBD facilita a extinção da memória de medo em humanos (DAS et al., 2013), o que abre a possibilidade de mais estudos envolvendo memórias de medo ou pacientes com TEPT sejam desenvolvidos.

Olhando para os resultados do presente trabalho de maneira translacional, a possibilidade da interferência na consolidação da memória de medo em um período dentro da janela temporal e não apenas imediatamente após a aquisição, é algo interessante para que talvez pessoas que passaram por uma situação traumática sejam prevenidas de desenvolver o TEPT ao receber o CBD, embora os estudos em relação ao mecanismo e mais trabalhos com humanos precisam ser feitos para de fato afirmar essa possibilidade.

## **8. Conclusões**

Com os resultados obtidos nesse trabalho confirma-se a hipótese de que o CBD quando infundido no HD é capaz de prejudicar a consolidação e a generalização da memória de medo durante a sua janela temporal. Os efeitos encontrados foram observados quando a infusão foi feita imediatamente e 1 hora após a aquisição, mas não aos 30 min e 3 horas.

Ainda, confirmou-se a participação dos receptores CB1 e CB2 do HD no efeito do CBD imediatamente após a aquisição. No entanto, nem esses receptores, nem o receptor 5-HT<sub>1A</sub> parecem estar envolvidos no efeito do CBD 1 hora após o condicionamento, sugerindo um mecanismo diferente dos investigados. Por fim, a administração sistêmica do CBD tanto imediatamente como 1 hora após o condicionamento reduz a expressão da proteína Arc no HD, o que sugere que o efeito do CBD também depende de mecanismos de plasticidade neuronal.

## 9. Referências

- ABUSH, H., AKIRAV, I. (2010). Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus* 20:1126–1138.
- ALBERINI, C. M. (2011). The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front Behav Neurosci.* 5:12.
- ALBERINI, C. M., LEDOUX, J. E. (2013). Memory reconsolidation. *Curr Biol.* 23: R746-50.
- AMERI, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* 58, 315–348.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.(2013). 5ª edição.
- BAILEY, C. R., CORDELL, E., SOBIN, S. M., NEUMEISTER, A. (2013). Recent progress in understanding the pathophysiology of post-traumatic stress disorder: implications for targeted pharmacological treatment.*CNS Drugs.* 27: 221-32.
- BALDI, E., LORENZINI, C. A., BUCHERELLI, C. (2004). Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81, 162-166.
- BASAVARAJAPPA, B. S., NAGRE, N. N., XIE, S., & SUBBANNA, S. (2014). Elevation of endogenous anandamide impairs LTP, learning, and memory through CB1 receptor signaling in mice. *Hippocampus*, 24(7), 808–818.
- BESNARD, A., LAROCHE, S., CABOCHE, J. (2014). Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Struct Funct* 219(1):415-430.
- Bhattacharyya, S., Falkenberg, I., Martin-Santos, R., Atakan, Z., Crippa, J. A., Giampietro, V., Brammer, M., McGuire, P. (2015). Cannabinoid Modulation of Functional Connectivity within Regions Processing Attentional Salience. *Neuropsychopharmacology*, 40(6), 1343–1352.
- BHATTACHARYYA, S., FUSAR-POLI, P., BORGWARDT, S., MARTINSANTOS, R., NOSARTI, C., O'CARROLL, C., ALLEN, P., SEAL, M. L., FLECHER, P. C., CRIPPA, J. A., GIAMPIETRO, V., MECHELLI, A., ATAKAN, Z., MCGUIRE, P. (2009). Modulation of mediotemporal and ventrostriatal function in humans by Delta9-tetrahydrocannabinol: a neural

- basis for the effects of *Cannabis sativa* on learning and psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 66: 442–451.
- BISOGNO, T., HANUS, L., DE PETROCELLIS, L., TCHILIBON, S., PONDE, D. E., BRANDI, I., MORIELLO, A. S., DAVIS, J. B., MECHOULAM, R., DI MARZO, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.*134: 845-52.
- BITENCOURT, R. M., PAMPLONA, F. A., TAKAHASHI, R. N. (2008). Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 18: 849-59.
- BLANCHARD, R. J., BLANCHARD, D. C., GRIEBEL, G., NUTT, D. (2008). Introduction to the handbook on fear and anxiety. In: *Handbook of anxiety and fear*. Elsevier, 17: 3-7.
- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. (1969). Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 68, 129-135.
- BLISS, T. V., COLLINGRIDGE, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-39.
- BLISS, T. V., LØMO, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232(2):331-356.
- BOUTON, M. E., MOODY, E. W. (2004). Memory processes in classical conditioning. *Neurosci Biobehav Rev* 28(7):663-674.
- BUSQUETS-GARCIA, A., PUIGHERMANAL, E., PASTOR, A., DE LA TORRE, R., MALDONADO, R., OZAITA, A. (2011). Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biological Psychiatry*, 70(5), 479–486.
- CAMPOS, A. C., DE PAULA SOARES, V., CARVALHO, M. C., FERREIRA, F. R., VICENTE, M. A., BRANDÃO, M. L., ZUARDI, A. W., ZANGROSSI, H., GUIMARÃES, F. S. (2013). Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. *Psychopharmacology*, 226(1), 13–24.
- CAMPOS, A. C., FOGAÇA, M. V., SONEGO, A. B., GUIMARÃES, F. S. (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Research*, 112, 119–127.

- CAMPOS, A. C., GUIMARÃES, F. S. (2008). Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 199: 223-30.
- CAMPOS, A. C., MOREIRA, F. A., GOMES, F. V., DEL BEL, E. A., GUIMARÃES, F. S. (2012). Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 367:3364-78.
- CARLINI, E. A., LEITE, J. R., TANNHAUSER, M., BERARDI, A. C. (1973). Letter: Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. *J Pharm Pharmacol*. 25: 664-5.
- CASAGRANDE, M. A., HAUBRICH, J., PEDRAZA, L. K., POPIK, B., QUILLFELDT, J. A., DE OLIVEIRA ALVARES, L. (2018). Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course. *Neurobiology of Learning and Memory*, 150, 42–47.
- CASTELLANO, C., CABIB, S., PALMISANO, A., DI MARZO, V., PUGLISI-ALLEGRA, S. (1997). The effects of anandamide on memory consolidation in mice involve both D1 and D2 dopamine receptors. *Behav. Pharmacol*. 8, 707-712.
- CHARNIAK, E., MCDERMOTT, D. (1985). *Introduction to artificial intelligence*. Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc. Boston, MA, USA.
- CHEN, A. C., ETKIN, A. (2013). Hippocampal network connectivity and activation differentiates post-traumatic stress disorder from generalized anxiety disorder. *Neuropsychopharmacology* 38(10):1889-1898.
- CHHATWAL, J.P., DAVIS, M., MAGUSCHAK, K.A., RESSLER, K.J. (2005). Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 30:516–524.
- CHOI, D. C., GOURLEY, S. L., RESSLER, K. J. (2012). Prelimbic BDNF and TrkB signaling regulates consolidation of both appetitive and aversive emotional learning. *Transl Psychiatry*. 2: e205.
- CLARKE, J. R., ROSSATO, J. I., MONTEIRO, S., BEVILAQUA, L. R. M., IZQUIERDO, I., CAMMAROTA, M. (2008). Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(2), 374–381.



- CREAMER, M., BURGESS, P., MCFARLANE, A.C. (2001). Post-traumatic stress disorder: findings from the Australian National Survey of Mental Health and Well-being. *Psychological medicine* 31 (7), 1237-1247
- CRIPPA, J. A., ZUARDI, A. W., GARRIDO, G. E., WICHERT-ANA, L., GUANIERI, R., FERRARI, L., AZEVEDO-MARQUES, P. M., HALLAK, J. E., MCGUIRE, P. K., FILHO BUSATTO, G. (2004). Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology*. 29: 417-26.
- CRIPPA, J.A.S., NOGUEIRA DERENUSON, G., BORDUQUI FERRARI, T., WICHERT-ANA, L., DURAN, F.L.S., MARTIN-SANTOS, R., VINÍCIUS SIMÕES, M., BHATTACHARYYA, S. FUSAR-POLI, P., ATAKAN, Z., SANTOS FILHO, A., FREITAS-FERRARI, M.C., MCGUIRE, P.K., ZUARDI, A.W., BUSATTO, G.F., HALLAK, J.E.C. (2011). Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: A preliminary report. *Journal of Psychopharmacology*, 25(1), 121–130.
- CZERNIAWSKI, J., REE, F., CHIA, C., RAMAMOORTHY, K., KUMATA, Y., OTTO, T. A. (2011). The Importance of Having Arc: Expression of the Immediate-Early Gene Arc Is Required for Hippocampus-Dependent Fear Conditioning and Blocked by NMDA Receptor Antagonism. *Journal of Neuroscience*, 31(31), 11200–11207.
- DA SILVA, T. R., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J., ANDREATINI, R., STERN, C. A. (2016). Evidence for an expanded time-window to mitigate a reactivated fear memory by tamoxifen. *Eur Neuropsychopharmacol*, 26: 1601-1609.
- DAS, R. K., KAMBOJ, S. K., RAMADAS, M., YOGAN, K., GUPTA, V., REDMAN, E., CURRAN, H. V., MORGAN, C. J. (2013). Cannabidiol enhances consolidation of explicit fear extinction in humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 226:781-92.
- DE AQUINO, J. P., SHERIF, M., RADHAKRISHNAN, R., CAHILL, J. D., RANGANATHAN, M., D'SOUZA, D. C. (2018). The Psychiatric Consequences of Cannabinoids. *Clinical Therapeutics*, 1–9.
- DE OLIVEIRA ALVARES, L., EINARSSON, E. O., SANTANA, F., CRESTANI, A. P., HAUBRICH, J., CASSINI, L. F., NADER, K., QUILLFELDT, J. A. (2012). Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* 22:1092–1095.
- DE OLIVEIRA ALVARES, L., ENGELKE, D.S., DIEHL, F., SCHEFFER-TEIXEIRA, R., HAUBRICH, J., DE FREITAS CASSINI, L., MOLINA, V.A. QUILLFELDT, J.A. (2010). Stress response recruits the hippocampal



- endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learning & Memory*, 17(4), 202–209.
- DE OLIVEIRA ALVARES, L., GENRO, B. P., DIEHL, F., QUILLFELDT, J. A. (2008). Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 1–9.
- DE PAULA SOARES, V., ZANGROSSI, H. (2004). Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin*, 64(2), 181–188.
- DE PETROCELLIS, L., LIGRESTI, A., MORIELLO, A.S., ALLARÀ, M., BISOGNO, T., PETROSINO, S., STOTT, C.G., DI MARZO, V. (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1479-1494.
- DEIANA, S., WATANABE, A., YAMASAKI, Y., AMADA, N., ARTHUR, M., FLEMING, S., WOODCOCK, H., DORWARD, P., PIGLIACAMPO, B., CLOSE, S., PLATT, B., RIEDEL, G. (2012). Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), D9; tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacol. (Berl.)* 219, 859-873
- DELORME, J. E., KODOTH, V., & ATON, S. J. (2018). Sleep loss disrupts Arc expression in dentate gyrus neurons. *Neurobiology of Learning and Memory*, (April), 0–1.
- DENNER, L. A., RODRIGUEZ-RIVERA, J., HAIDACHER, S. J., JAHRLING, J. B., CARMICAL, J. R., HERNANDEZ, C. M., DINELEY, K. T. (2012). Cognitive Enhancement with Rosiglitazone Links the Hippocampal PPAR and ERK MAPK Signaling Pathways. *Journal of Neuroscience*, 32(47), 16725–16735.
- DEVANE, W. A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R. G., STEVENSON, L. A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A., MECHOULAM, R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258(5090):1946-9.
- DO MONTE, F.H., SOUZA, R.R., BITENCOUTI, R.M., KROON, J.A., TAKAHASHI, R.N. (2013). Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. *Behav Brain Res.* 250:23-7.

- DUDAI, Y. (2002). *Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond*. Oxford University Press.
- DUDAI, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annu Rev Psychol*, 55(1), 51–86.
- EDWARDS, J.G. (2014). TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications. *Prog Drug Res*. 68:77-104.
- EGERTOVA, M., GIANG, D. K., CRAVATT, B. F., ELPHICK, M. R. (1998). A new perspective on cannabinoid signalling: Complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc. Biol. Sci.* 265, 2081-2085.
- EHLERS, A., HACKMANN, A., MICHAEL, T. (2004). Intrusive re-experiencing in post-traumatic stress disorder: phenomenology, theory, and therapy. *Memory* 12:403-415.
- EICHENBAUM, H. (2004). Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 44(1), 109–120.
- EINARSSON, E. Ö., NADER, K. (2012). Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem.* 19:449-52.
- ELBATSH, M. M., ASSAREH, N., MARSDEN, C. A., KENDALL, D. A. (2012). Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats. *Psychopharmacology*, 221(2), 239–247.
- ELMES, M. W., KACZOCHA, M., BERGER, W. T., LEUNG, K., RALPH, B. P., WANG, L., SWEENEY, J. M., MIYAUCHI, J. T., TSIRKA, S. E., OJIMA, I., DEUTSCH, D. G. (2015). Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for D9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). *J. Biol. Chem.* 290, 8711-8721.
- ESPOSITO, G., SCUDERI, C., VALENZA, M., TOGNA, G. I., LATINA, V., DE FILIPPIS, D., CIPRIANO, M., CARRATÙ, M. R., IUVONE, T., STEARDO, L. (2011). Cannabidiol reduces A $\beta$ -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR $\gamma$  involvement. *PLoS ONE*, 6(12).
- FANSELOW, M. S. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic Bulletin & Review*, 1(4), 429–438.

- FANSELOW, M. S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110(1-2):73-81.
- FANSELOW, M. S. (2010). From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends Cogn. Sci.* 14, 7-15.
- FANSELOW, M. S., DONG, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65(1):7-19.
- FANSELOW, M. S., PONNUSAMY, R. (2008). The use of conditioning tasks to model fear and anxiety In: *Handbook of anxiety and fear*. Elsevier. 17: 46 – 65.
- FERNANDEZ, S. P., MUZERELLE, A., SCOTTO-LOMASSESE, S., BARIK, J., GRUART, A., DELGADO-GARCÍA, J. M., GASPAR, P. (2017). Constitutive and Acquired Serotonin Deficiency Alters Memory and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neuropsychopharmacology*, 42(2), 512–523.
- FERNÁNDEZ-RUIZ, J., SAGREDO, O., PAZOS, M. R., GARCÍA, C., PERTWEE, R., MECHOULAM, R., & MARTÍNEZ-ORGADO, J. (2013). Cannabidiol for neurodegenerative disorders: Important new clinical applications for this phytocannabinoid? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(2), 323–333.
- FINSTERWALD, C., STEINMETZ, A. B., TRAVAGLIA, A., ALBERINI, C. M. (2015). From memory impairment to posttraumatic stress disorder-like phenotypes: the critical role of an unpredictable second traumatic experience. *J. Neurosci.* 35, 15903-15915.
- FLEURKENS, P., RINCK, M., VAN MINNEN, A. (2011). Specificity and generalization of attentional bias in sexual trauma victims suffering from posttraumatic stress disorder. *J Anxiety Disord* 25(6):783-787.
- FLEXNER, L. B., FLEXNER, J. B., ROBERTS, R. B. (1967). Memory in Mice Analyzed with Antibiotics. *Science*, 155(3768), 1377–1383.
- FOGAÇA, M. V., CAMPOS, A. C., COELHO, L. D., DUMAN, R. S., GUIMARÃES, F. S. (2018). The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. *Neuropharmacology*, 135, 22–33.
- FOGAÇA, M. V., REIS, F. M. C. V, CAMPOS, A. C., GUIMARÃES, F. S. (2014). Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: Involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. *Eur Neuropsychopharmacol*, 24(3), 410–419.

- FUSAR-POLI, P., CRIPPA, J. A., BHATTACHARYYA, S., BORGWARDT, S. J., ALLEN, P., MARTIN-SANTOS, R., SEAL, M., SURGULADZE, S. A., O'CARROL, C., ATAKAN, Z., ZUARDI, A. W., MCGUIRE, P. K. (2009). Distinct effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. *Arch Gen Psychiatry*. 66: 95-105.
- GAFFORD, G. M. (2005). Effects of post-training hippocampal injections of midazolam on fear conditioning. *Learning & Memory*, 12(6), 573–578.
- GARCÍA-GUTIERREZ, M.S., ORTEGA-ALVARO, A., BUSQUETS-GARCÍA, A., PEREZ-ORTIZ, J.M., CALTANA, L., RICATTI, M.J., BRUSCO, A., MALDONADO, R., MANZANARES, J. (2013). Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. *Neuropharmacology* 73, 388-396.
- GAZARINI, L. (2015). Revisitando os mecanismos de modulação noradrenérgica sobre as memórias de medo: do fisiológico ao disfuncional. Tese. (Doutorado em Farmacologia). UFSC.
- GAZARINI, L., STERN, C. A., CAROBREZ, A. P., BERTOGLIO, L. J. (2013). Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -adrenergic receptors. *Learn. Mem.* 20, 210-219.
- GAZARINI, L., STERN, C.A., PIORNEDO, R. R., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J., (2014). PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18 pii: pyu026.
- GHOSH, S., CHATTARJI, S. (2015). Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. *Nat Neurosci* 18(1):112-120.
- GIACHERO, M., BUSTOS, S. G., CALFA, G., MOLINA, V. A. (2013). A BDNF sensitive mechanism is involved in the fear memory resulting from the interaction between stress and the retrieval of an established trace. *Learn Mem.* 20(5): 245-55.
- GIBSON, H.E., EDWARDS, J. G., PAGE, R. S., VAN HOOK, M. J., KAUER, J. A. (2008). TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* 57:746–59
- GIUFFRIDA, A., BELTRAMO, M., PIOMELLI, D. (2001). Mechanisms of endocannabinoid inactivation: Biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 7–14.

- GOBIRA, P.H., LIMA, I.V., BATISTA, L.A., DE OLIVEIRA, A.C., RESSTEL, L.B., WOTJAK, C.T., AGUIAR, D.C., MOREIRA, F.A. (2017). N-arachidonoyl-serotonin, a dual FAAH and TRPV1 blocker, inhibits the retrieval of contextual fear memory: Role of the cannabinoid CB1 receptor in the dorsal hippocampus. *J Psychopharmacol.* 31(6):750-756.
- GOMES, F. V., REIS, D. G., ALVES, F. H., CORRÊA, F. M., GUIMARÃES, F. S., RESSTEL, L. B. (2012). Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *J Psychopharmacol.* 26: 104-113.
- GRANADO, N., ORTIZ, O., SUÁREZ, L. M., MARTÍN, E. D., CEÑA, V., SOLÍS, J. M., MORATALLA, R. (2008). D1 but not D5 dopamine receptors are critical for LTP, spatial learning, and LTP-Induced arc and zif268 expression in the hippocampus. *Cereb Cortex* 18(1):1-12.
- GUIMARÃES, F. S., CHIARETTI, T. M., GRAEFF, F. G., ZUARDI, A. W. (1990). Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*. 100: 558-9.
- GUZOWSKI, J. F., LYFORD, G. L., STEVENSON, G. D., HOUSTON, F. P., MCGAUGH, J. L., WORLEY, P. F., BARNES, C. A. (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *The Journal of Neuroscience*, 20(11), 3993–4001
- HAMPSON, R. E., DEADWYLER, S. A. (1999). Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sci.* 65, 715–723
- HEBB, D. O. (1949). *The Organisation of Behaviour*. New York: Wiley.
- HERKENHAM, M., LYNN, A. B., JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S., DE COSTA, B. R., RICE, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563–583.
- HERMANS, E. J., BATTAGLIA, F. P., ATSAK, P., DE VOOGD, L. D., FERNÁNDEZ, G., ROOZENDAAL, B. (2014). How the amygdala affects emotional memory by altering brain network properties. *Neurobiol Learn Mem* 112:2-16.
- HEROUX, N.A., OSBORNE, B.F., MILLER, L.A., KAWAN, M., BUBAN, K.N., ROSEN, J.B., STANTON, M.E. (2018). Differential expression of the immediate early genes c-Fos, Arc, Egr-1, and Npas4 during long-term memory formation in the context preexposure facilitation effect (CPFE). *Neurobiol Learn Mem.* 147:128-138.

- HILL, M. N., BIERER, L. M., MAKOTKINE, I., GOLIER, J. A., GALEA, S., MCEWEN, B. S., HILLARD, C. J., YEHUDA, R. (2013). Reductions in circulating endocannabinoid levels in individuals with posttraumatic stress disorder following exposure to the world trade center attacks. *Psychoneuroendocrinology*. 38:2952-61.
- HILL, M. N., GORZALKA, B. B. (2009). The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets* 8, 451-458.
- HOWLETT, A. C., BARTH, F., BONNER, T. I., CABRAL, G., CASELLAS, P., DEVANE, W. A., FELDER, C. C., HERKENHAM, M., MACKIE, K., MARTIN, B. R., MECOULAM, R., PERTWEE, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54(2): 161-202.
- HUGHES, K. C., SHIN, L. M. (2011). Functional neuroimaging studies of posttraumatic stress disorder. *Expert Rev Neurother.* 11: 275-85.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68(3):285-316.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H., VIANNA, M. R., IZQUIERDO, L. A., BARROS, D. M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103(1):1-11.
- IZQUIERDO, I., ORSINGER, O. A., BERARDI, A. C. (1973). Effect of cannabidiol and of other cannabis sativa compounds on hippocampal seizure discharges. *Psychopharmacology*. 28: 95-102.
- IZZO, A. A., BORRELLI, F., CAPASSO, R., DI MARZO, V., MECOULAM, R. (2009). Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends of Pharmacology Sciences*, 30: 515-27.
- JAHLING, J.B., HERNANDEZ, C.M., DENNER, L., DINELEY, K.T. (2014). PPAR $\gamma$  recruitment to active ERK during memory consolidation is required for Alzheimer's disease-related cognitive enhancement. *J Neurosci.* 34(11):4054-63.
- JOVANOVIĆ, T., KAZAMA, A., BACHEVALIER, J., DAVIS, M. (2012). Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD. *Neuropharmacology* 62(2):695-704.



- JOVANOVIC, T., NORRHOLM, S. D., FENNELL, J. E., KEYES, M., FIALLOS, A. M., MYERS, K. M., DAVIS, M., DUNCAN, E. J. (2009). Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: relation to symptom severity. *Psychiatry Res* 167:151-160.
- KIM, J. J., JUNG, M. W. (2006). Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 30(2):188-202.
- KIM, S. R. LEE, D. Y., CHUNG, E. S., OH, U. T., KIM, S. U., JIN, B. K. (2005). Transient receptor potential vanilloid subtype-1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 25, 662–671
- KIM, S.R., KIM, S. U., OH, U. T., JIN, B. K. (2006). Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vitro and in vivo via Ca<sup>2+</sup>-mediated mitochondrial damage and cytochrome-c release. *J. Immunol.* 177, 4322–4329
- KORB, E., FINKBEINER, S. (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci* 34(11):591-598.
- KOSTEK, J. A., BECK, K. D., GILBERTSON, M. W., ORR, S. P., PANG, K. C., SERVATIUS, R. J., MYERS, C. E. (2014). Acquired Equivalence in U.S. Veterans With Symptoms of Posttraumatic Stress: Reexperiencing Symptoms Are Associated With Greater Generalization. *J Trauma Stress* 27(6):717-720.
- KROON, J. A., CAROBREZ, A. P. (2009). Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91, 32-40.
- LAMPRECHT, R., LEDOUX, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(1), 45–54.
- LARICCHIUTA, D., CENTONZE, D., PETROSINI, L. (2013). Effects of endocannabinoid and endovanilloid systems on aversive memory extinction. *Behav Brain Res* 256:101–107.
- LATTAL, K. M., ABEL, T. (2004). Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4667-72.
- LEDGERWOOD, C. J., GREENWOOD, S. M., BRETT, R. R., PRATT, J. A., & BUSHELL, T. J. (2011). Cannabidiol inhibits synaptic transmission in rat hippocampal cultures and slices via multiple receptor pathways. *British Journal of Pharmacology*, 162(1), 286–294.



- LEDOUX, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 23: 155–184.
- LEE, J. L. C., BERTOGLIO, L. J., GUIMARÃES, F. S., STEVENSON, C. W. (2017). Cannabidiol regulation of emotion and emotional memory processing: relevance for treating anxiety-related and substance abuse disorders. *British Journal of Pharmacology*, 174(19), 3242–3256.
- LE MOS, J. I., RESSEL, L. B., GUIMARÃES, F. S. (2010). Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res.* 207:105-11.
- LEVY-GIGI, E., SZABO, C., RICHTER-LEVIN, G., KÉRI, S. (2015). Reduced Hippocampal Volume Is Associated With Overgeneralization of Negative Context in Individuals With PTSD. *Neuropsychology* 29(1):151-161.
- LEWEKE, F. M., PIOMELLI, D., PAHLISCH, F., MUHL, D., GERTH, C. W., HOYER, C., KLOSTERKÖTTER, J., HELLMICH, M., KOETHE, D. (2012). Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2: e94.
- LI, L., CARTER, J., GAO, X., WHITEHEAD, J., TOURTELLOTT, W.G. (2005). The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol Cell Biol* 25(23):10286-10300.
- LI, Y., KIM, J. (2017). Distinct roles of neuronal and microglial CB2 cannabinoid receptors in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, 363(August), 11–25.
- LIN, Q. S., YANG, Q., LIU, D. D., SUN, Z., DANG, H., LIANG, J., LI, S. T. (2011). Hippocampal endocannabinoids play an important role in induction of long-term potentiation and regulation of contextual fear memory formation. *Brain Research Bulletin*, 86(3–4), 139–145.
- LISBOA, S.F., GOMES, F.V., SILVA, A.L., ULIANA, D.L., CAMARGO, L.H., GUIMARÃES, F.S., CUNHA, F.Q., JOCA, S.R., RESSEL, L.B. (2015). Increased contextual fear conditioning in iNOS knockout mice: additional evidence for the involvement of nitric oxide in stress-related disorders and contribution of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol* 18(8).
- LONERGAN, M.E., GAFFORD, G.M., JAROME, T.J., HELMSTETTER, F.J. (2010). Time-dependent expression of Arc and zif268 after acquisition of fear conditioning. *Neural Plast.* 2010:139891.
- LUNARDI, P., SACHSER, R. M., SIERRA, R. O., PEDRAZA, L. K., MEDINA, C., DE LA FUENTE, V., DE OLIVEIRA ALVARES, L. (2018). Effects of

- Hippocampal LIMK Inhibition on Memory Acquisition, Consolidation, Retrieval, Reconsolidation, and Extinction. *Molecular Neurobiology*, 55(2), 958–967.
- LYNCH, J. F., WINIECKI, P., GILMAN, T. L., ADKINS, J. M., & JASNOW, A. M. (2017). Hippocampal GABAB(1a) Receptors Constrain Generalized Contextual Fear. *Neuropsychopharmacology*, 42(4), 914–924.
- MACKOWIAK, M., CHOCYK, A., DUDYS, D., WEDZONY, K. (2009). Activation of CB1 cannabinoid receptors impairs memory consolidation and hippocampal polysialylated neural cell adhesion molecule expression in contextual fear conditioning. *Neuroscience* 158, 1708-1716.
- MALIN, E. L., MCGAUGH, J. L. (2006). Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(6):1959-1963.
- MANDREKAR-COLUCCI, S., LANDRETH, G.E. (2011). Nuclear receptors as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 15(9):1085-97.
- MANWELL, L.A., SATVAT, E., LANG, S.T., ALLEN, C.P., LERI, F., PARKER, L.A. (2009). FAAH inhibitor, URB-597, promotes extinction and CB(1) antagonist, SR141716, inhibits extinction of conditioned aversion produced by naloxone-precipitated morphine withdrawal, but not extinction of conditioned preference produced by morphine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 94:154–162.
- MARSCH, R., FOELLER, E., RAMMES, G., BUNCK, M., KOSSL, M., HOLSBOER, F., ZIEGLGÄNSBERGER, W., LANDGRAF, R., LUTZ, B., WOTJAK, C. T. (2007). Reduced Anxiety, Conditioned Fear, and Hippocampal Long-Term Potentiation in Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptor-Deficient Mice. *Journal of Neuroscience*, 27(4), 832–839.
- MARTÍNEZ-PINILLA, E., VARANI, K., REYES-RESINA, I., ANGELATS, E., VINCENZI, F., FERREIRO-VERA, C., OYARZABAL, J., CANELA, E.I., LANCIEGO, J.L., NADAL, X., NAVARRO, G., BOREA, P.A., FRANCO, R. (2017). Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB2receptors. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 1–10.
- MATUS, A. (2000). Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science*, 290(5492), 754–758.

- MCGAUGH, J. L. (1983). Hormonal influences on memory. *Annu Rev Psychol* 34:297-323
- MCGAUGH, J. L. (2000). Memory - a century of consolidation. *Science*.14287: 248-51.
- MCKINNEY, M.K., CRAVATT, B.F. (2005). Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 411–432.
- MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N. E., SCHATZ, A. R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B. R., COMPTON, D. R., PERTWEE, R. G., GRIFFIN, G., BAYEWITCH, M., BARG, J., VOGEL, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50(1):83-90.
- MECHOULAM, R., PARKER, L. A., GALLILY, R. (2002). Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol*.42: 11S-19S.
- MECHOULAM, R., SHANI, A., EDERY, H., GRUNFELD, Y. (1970). Chemical basis of hashish activity. *Science.* 169(945):611-2.
- MESSAOUDI, E., KANHEMA, T., SOULE, J., TIRON, A., DAGYTE, G., DA SILVA, B., & BRAMHAM, C. R. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 Synthesis Controls Long-Term Potentiation Consolidation through Regulation of Local Actin Polymerization in the Dentate Gyrus In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 27(39), 10445–10455.
- MICHOPOULOS, V., NORRHOLM, S. D., JOVANOVIĆ, T. (2015). Diagnostic Biomarkers for Posttraumatic Stress Disorder: Promising Horizons from Translational Neuroscience Research *Biol Psychiatry.* 78:344-53.
- MOREIRA, F. A., AGUIAR, D. C., TERZIAN, A. L. B., GUIMARÃES, F. S., WOTJAK, C. T. (2012). Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? *Neuroscience*, 204, 186–192.
- MORENA, M., ROOZENDAAL, B., TREZZA, V., RATANO, P., PELOSO, A., HAUER, D., ATSAK, P., TRABACE, L., CUOMO, V., MCGAUGH, J.L., SCHELLING, G., CAMPOLONGO, P. (2014). Endogenous cannabinoid release within prefrontal-limbic pathways affects memory consolidation of emotional training. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 18333-18338.
- MORGESE, M.G., CASSANO, T., CUOMO, V., GIUFFRIDA, A. (2007) Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB1 and TRPV1 receptors. *Exp. Neurol.* 208, 110–119

- MORIN, J. P., CERÓN-SOLANO, G., VELÁZQUEZ-CAMPOS, G., PACHECO-LÓPEZ, G., BERMÚDEZ-RATTONI, F., DÍAZ-CINTRA, S. (2016). Spatial Memory Impairment is Associated with Intraneural Amyloid- $\beta$  Immunoreactivity and Dysfunctional Arc Expression in the Hippocampal-CA3 Region of a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 51(1), 69–79.
- MORIN, J. P., DÍAZ-CINTRA, S., BERMÚDEZ-RATTONI, F., DELINT-RAMÍREZ, I. (2016). Decreased levels of NMDA but not AMPA receptors in the lipid-raft fraction of 3xTg-AD model of Alzheimer's disease: Relation to Arc/Arg3.1 protein expression. *Neurochemistry International*, 100, 159–163.
- MÜLLER, G. E., PILZECKER, A. (1900). Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z. Psychol. Ergänzungsband* 1: 1–300.
- MUNRO, S., THOMAS, K.L., ABU-SHAAR, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365(6441):61-5.
- NADER K. (2003). Memory traces unbound. *Trends in Neuroscience*. v. 26, p. 65-72.
- NASEHI, M., GERAMI, P., KHAKPAI, F., ZARRINDAST, M. R. (2018). Dorsal hippocampal cannabinergic and GABAergic systems modulate memory consolidation in passive avoidance task. *Brain Research Bulletin*, 137, 197–203.
- NASEHI, M., HAJIKHANI, M., EBRAHIMI-GHIRI, M., ZARRINDAST, M.R. (2017). Interaction between NMDA and CB2 function in the dorsal hippocampus on memory consolidation impairment: an isobologram analysis. *Psychopharmacol. (Berl.)* 234, 507-514.
- NESTLER, E. J., HYMAN, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13(10):1161-1169.
- NEUMEISTER, A. (2013). The endocannabinoid system provides an avenue for evidencebased treatment development for PTSD. *Depress Anxiety*. 30: 93-6.
- NEUMEISTER, A., NORMANDIN, M.D., PIETRZAK, R.H., PIOMELLI, D., ZHENG, M.Q., GUJARRO-ANTON, A., POTENZA, M.N., BAILEY, C.R., LIN, S.F., NAJAFZADEH, S., ROPCHAN, J., HENRY, S., CORSI-TRAVALI, S., CARSON, R.E., HUANG, Y. (2013). Elevated brain cannabinoid CB1 receptor availability in post-traumatic stress disorder: a positron emission tomography study. *Mol. Psychiatry* 18, 1034-1040.

- NEUMEISTER, A., SEIDEL, J., RAGEN, B. J., PIETRZAK, R. H. (2015). Translational evidence for a role of endocannabinoids in the etiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 51:577-584.
- NEVES, G., COOKE, S. F., BLISS, T. V. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9(1):65-75.
- NORRHOLM, S. D., JOVANOIC, T., BRISCIONE, M. A., ANDERSON, K. M., KWON, C. K., WARREN, V. T., BOSSHARDT, L., BRADLEY, B. (2014). Generalization of fear-potentiated startle in the presence of auditory cues: a parametric analysis. *Front Behav Neurosci* 8:361.
- NORRIS, C., LOUREIRO, M., KRAMAR, C., ZUNDER, J., RENARD, J., RUSHLOW, W., LAVIOLETTE, S.R. (2016). Cannabidiol modulates fear memory formation through interactions with serotonergic transmission in the mesolimbic system. *Neuropsychopharmacology* 41, 2839e2850.
- O'KEEFE, J., NADEL, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Oxford University Press.
- ONAIWI, E. S. (2006). Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology* 54(4):231-46.
- PACHER, P., BATKAI, S., KUNOS, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 58(3):389-462.
- PAMPLONA, F.A., BITENCOURT, R.M., TAKAHASHI, R.N. (2008). Short- and long- term effects of cannabinoids on the extinction of contextual fear memory in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90:290–293.
- PARÉ, D. (2002). Mechanisms of Pavlovian fear conditioning: has the engram been located? *Trends Neurosci* 25(9):436-438.
- PAVLOV, I. P. (1927). *Conditioned Reflexes*. London: Oxford University Press.
- PAXINOS, G., WATSON, C. (2009). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact sixth ed. Academic Press, San Diego.
- PEEBLES, C. L., YOO, J., THWIN, M. T., PALOP, J. J., NOEBELS, J. L., FINKBEINER, S. (2010). Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18173–18178.
- PERTWEE, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 74(2):129-80. Review.

- PIRI, M., ZARRINDAST, M. R. (2011). Modulation of WIN55,212-2 state-dependent memory by  $\alpha$ 2-adrenergic receptors of the dorsal hippocampus. *Arch Iran Med.* 14(6):389-95.
- PISANTI, S., MALFITANO, A. M., CIAGLIA, E., LAMBERTI, A., RANIERI, R., CUOMO, G., ABATE, M., FAGGIANA, G., PROTO, M. C., FIORE, D. LAEZZA, C., BIFULCO, M. (2017). Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacology and Therapeutics*, 175, 133–150.
- PLATH, N., OHANA, O., DAMMERMAN, B., ERRINGTON, M.L., SCHMITZ, D., GROSS, C., MAO, X., ENGELSBERG, A., MAHLKE, C., WELZL, H., KOBALZ, U., STAWRAKAKIS, A., FERNANDEZ, E., WALTEREIT, R., BICK-SANDER, A., THERSTAPPEN, E., COOKE, S.F., BLANQUET, V., WURST, W., SALMEN, B., BÖSL, M.R., LIPP, H.P., GRANT, S.G., BLISS, T.V., WOLFER, D.P., KUHL, D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52(3):437-444.
- PRZIBYLASWSKI, J., SARA, S. J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Beh Brain Resear.* 84:241-6. 17.
- PUENTE, N., CUI, Y., LASSALLE, O., LAFOURCADE, M., GEORGES, F., VENANCE, L., GRANDES, P., MANZONI, O.J. (2011). Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat Neurosci.*14: 1542-7.
- RATANO, P., PALMERY, M., TREZZA, V., CAMPOLONGO, P. (2017). Cannabinoid modulation of memory consolidation in rats: Beyond the role of cannabinoid receptor subtype 1. *Frontiers in Pharmacology*, 8(APR), 1–13.
- ROSSIGNOLI, M.T., LOPES-AGUIAR, C., RUGGIERO, R.N., DO VAL DA SILVA, R.A., BUENO-JUNIOR, L.S., KANDRATAVICIUS, L., PEIXOTO-SANTOS, J.E., CRIPPA, J.A., CECILIO HALLAK, J.E., ZUARDI, A.W., SZAWKA, R.E., ANSELMO-FRANCI, J., LEITE, J.P., ROMCY-PEREIRA, R.N. (2017). Selective post-training time window for memory consolidation interference of cannabidiol into the prefrontal cortex: reduced dopaminergic modulation and immediate gene expression in limbic circuits. *Neuroscience* 350, 85-93.
- RUSSO, E. B., BURNETT, A., HALL, B., PARKER, K. K. (2005). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res* 30:1037-1043.
- SCHMIDT, S.D., FURINI, C.R.G., ZINN, C.G., CAVALCANTE, L.E., FERREIRA, F.F., BEHLING, J.A.K., MYSKIW, J.C., IZQUIERDO, I. (2016). Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear



- memory by three different serotonin receptors in hippocampus. *Neurobiol Learn Mem.* 142(Pt A):48-54.
- SCOVILLE, W. B., MILNER, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Psychiatry* 20:11–21.
- SHEPHERD, J. D., BEAR, M. F. (2011). New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci*, 14(3), 279–284.
- SHIRI, M., KOMAKI, A., ORYAN, S., TAHERI, M., KOMAKI, H., ETAEE, F. (2016). Effects of cannabinoid and vanilloid receptor agonists and their interactions on learning and memory in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, cjpp-2016-0274.
- SHOSHAN, N., AKIRAV, I. (2017). The effects of cannabinoid receptors activation and glucocorticoid receptors deactivation in the amygdala and hippocampus on the consolidation of a traumatic event. *Neurobiology of Learning and Memory*, 144, 248–258.
- SMART, D., GUNTHORPE, M.J., JERMAN, J.C., NASIR, S., GRAY, J., MUIR, A.I., CHAMBERS, J.K., RANDALL, A.D., DAVIS, J.B. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol.* 129(2):227-30.
- SONG, C., STEVENSON, C.W., GUIMARÃES, F.S., LEE, J.L. (2016). Bidirectional effects of cannabidiol on contextual fear memory extinction. *Front. Pharmacol.* 7, 493.
- STEIN, D. J., IPSEY, J. C., SEEDAT, S., SAGER, C., AMOS, T. (2006). Pharmacotherapy for post traumatic stress disorder (PTSD). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1).
- STERN, C. A. J., DA SILVA, T. R., RAYMUNDI, A. M., DE SOUZA, C. P., HIROAKI-SATO, V. A., KATO, L., GUIMARÃES, F. S., ANDREATINI, R., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J. (2017). Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB1 and CB2 receptors. *Neuropharmacology*. 125, 220-230.
- STERN, C. A. J., GAZARINI, L., VANVOSSSEN, A. C., ZUARDI, A. W., GALVE-ROPERTH, I., GUIMARAES, F. S., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J. (2015).  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol alone and combined with cannabidiol mitigate fear memory through reconsolidation disruption. *European Neuropsychopharmacology*, 25(6):958-65.
- STERN, C.A.J., GAZARINI, L., TAKAHASHI, R.N., GUIMARÃES, F.S., BERTOGLIO, L.J. (2012). On disruption of fear memory by reconsolidation



- blockade: evidence from cannabidiol treatment. *Neuropsychopharmacology*, 37, 2132-2142.
- STIEDL, O., MISANE, I., SPIESS, J., OGREN, S. O. (2000). Involvement of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors in classical fear conditioning in C57BL/6J mice. *The Journal of Neuroscience*, 20(22), 8515–27.
- TAN, H., LAUZON, N. M., BISHOP, S. F., CHI, N., BECHARD, M., LAVIOLETTE, S. R. (2011). Cannabinoid transmission in the basolateral amygdala modulates fear memory formations via functional inputs to the prelimbic. *J Neurosci*.31: 5300-5312.
- TANIELIAN, T., JAYCOX, L.H. (2005). *Invisible Wounds of War: Psychological and Cognitive Injuries, Their Consequences, and Services to Assist Recovery*. RAND Center for Military Health Policy Research. RAND Corporation.
- THOMAS, A., BAILLIE, G.L., PHILLIPS, A.M., RAZDAN, R.K., ROSS, R.A., PERTWEE, R.G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*.150: 613-23.
- TREZZA, V., CAMPOLONGO, P. (2013). The endocannabinoid system as a possible target to treat both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Front. Behav. Neurosci.* 7, 100.
- TSOU, K., BROWN, S., SANUDO-PENA, M. C., MACKIE, K., WALKER, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411.
- TULVING, E. (1983). *Elements of Episodic Memory*. Oxford: Clarendon Press
- VANZ, F., BICCA, M. A., LINARTEVICH, V. F., GIACHERO, M., BERTOGLIO, L. J., MONTEIRO DE LIMA, T. C. (2018). Role of dorsal hippocampus  $\kappa$  opioid receptors in contextual aversive memory consolidation in rats. *Neuropharmacology*, 135, 253–267.
- VERTES, R. P. (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142(1):1-20.
- WILSON, R. I., NICOLL, R. A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588–592.
- WILTGEN, B. J., SILVA, A. J. (2007). Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem* 14(4):313-317.

- WILTGEN, B. J., ZHOU, M., CAI, Y., BALAJI, J., KARLSSON, M. G., PARIVASH, S. N., LI, W., SILVA, A. J. (2010). The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr Biol* 20:1336–1344.
- WINOCUR, G., MOSCOVITCH, M., SEKERES, M. (2007). Memory consolidation or transformation: Context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nat Neurosci* 10:555–557.
- XU, W., SÜDHOF, T. C. (2013). A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339:1290-1295.
- YANG, K., LEI, G., XIE, Y. F., MACDONALD, J. F., & JACKSON, M. F. (2014). Differential regulation of NMDAR and NMDAR-mediated metaplasticity by anandamide and 2-AG in the hippocampus. *Hippocampus*, 24(12), 1601–1614.
- ZHU, R. T., LIU, X. H., SHI, Y. W., WANG, X. G., XUE, L., ZHAO, H. (2018). Propranolol can induce PTSD-like memory impairments in rats. *Brain and Behavior*, 8(2), 1–14.
- ZUARDI, A. W., COSME, R. A., GRAEFF, F. G., GUIMARÃES, F. S. (1993). Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. *J Psychopharmacol*.7: 82-8.
- ZUARDI, A. W., SHIRAKAWA, I., FINKELFARB, E., KARNIOL, I. G. (1982). Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 76: 245-50.
- ZYGMUNT, P. M., PETERSSON, J., ANDERSSON, D. A., CHUANG, H., SØRGÅRD, M., DI MARZO, V., JULIUS, D., HÖGESTÄTT, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 29;400(6743):452-7.